

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

Université de Sherbrooke

**Caractérisation et application de lignées gastriques
épithéliales pour l'étude de la régulation des fonctions
digestives de l'estomac humain**

par

Mélissa Chénard

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc)**

Juin 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74336-5

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
LISTE DES ILLUSTRATIONS	XI
RÉSUMÉ	
I. INTRODUCTION	1
A) Avant-propos	1
B) L'estomac	3
C) La glande gastrique	4
D) Les types cellulaires gastriques et leurs fonctions	5
E) Spécialisation des glandes gastriques	6
F) Différenciation des cellules principales	7
G) Régulation de la différenciation des cellules principales	8
1. Effet des glucocorticoïdes	8
2. Effet de la matrice extracellulaire et des récepteurs de type intégrine	9
H) Localisation des zymogènes gastriques	11
I) La lipase gastrique humaine	13
1. Ses caractéristiques	13
2. Son rôle en général	14
2.1 Son rôle chez un sujet normal	15
2.2 Son rôle chez le nouveau-né	16
2.3 Son rôle dans le cas d'insuffisance pancréatique pathologique	17

J) Ontogénèse des zymogènes gastriques	17
K) Régulation de la sécrétion des zymogènes gastriques	19
L) Régulation de l'expression du gène de la lipase gastrique	20
M) Les lignées gastriques cancéreuses comme modèle d'étude	21
N) Plan expérimental du mémoire	23
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
A) Localisation tissulaire de la laminine-5 et des récepteurs de type intégrine	26
1. Obtention des spécimens	26
2. Immunofluorescence indirecte	27
3. Anticorps utilisés	28
B) Caractérisation des modèles cellulaires	30
1. Lignées cellulaires	30
1.1 NCI-N87	30
1.2 HGM.34	31
1.3 HGE.20	32
2. Morphologie cellulaire	32
3. Microscopie électronique à balayage	32
4. Immunofluorescence indirecte	33
4.1 Sous-unités des intégrines et de la pompe gastrique $H^+K^+ATPase$	33
4.2 Lipase gastrique et pepsinogène-5	34
4.3 Récepteurs de facteurs de croissance	36
4.4 Marqueurs des jonctions cellulaires	37
4.4.1 Zonulae adherens	37

4.4.2 Zonulae occludens	37
4.5 Mucine-6	38
5. Coloration au PAS	38
6. Dosages	39
6.1 Préparation des échantillons	39
6.2 Dosage des protéines	40
6.3 Dosage lipase	40
6.4 Dosage pepsine	42
7. Modulation de la synthèse sécrétion	43
7.1 Facteurs de croissance et hormones	43
7.2 Co-culture NCI-N87/HGE.34	44
7.3 Clonage des NCI-N87	44
7.4 Culture des HGE.20 sur une matrice de laminine-1	45
8. Immunobuvardage de type Western blot	45
8.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	45
8.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	46
8.3 Détection par chemiluminescence	47
8.3.1 Détection de la lipase gastrique humaine	47
8.3.2 Détection du récepteur de l'EGF	47
III. RÉSULTATS	48A
A) Immunolocalisation de la laminine-5 et des sous-unités des intégrines dans l'estomac fœtal humain en développement	48A
1. Localisation de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5	48A
2. Localisation de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines	50
3. Localisation de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines	52

4. Localisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines	52
5. Localisation de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines	57
6. Localisation de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines	60
7. Localisation de la sous-unité $\alpha 7A$ et $\alpha 7B$ des intégrines	60
8. Localisation de la sous-unité αv des intégrines	62
9. Localisation de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines	63
B) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	63
1. Morphologie cellulaire	63
2. Expression des récepteurs de facteurs de croissance	66
3. Expression des sous-unités de type intégrine	68
4. Expression des marqueurs de polarisation et de différenciation cellulaire	70
4.1. Marqueurs des jonctions cellulaires	70
4.2. Marqueurs des cellules à mucus	72
4.3. Marqueurs des cellules pariétales	72
4.4. Marqueurs des cellules principales	74
5. Capacité de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives	74
6. Modulation de l'activité enzymatique à post-confluence	77
C) Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes	80
1. Effet des modulateurs sur une culture confluyente	80
2. Effet des modulateurs sur une culture à six jours post-confluence	83
D) Caractérisation d'un système de co-culture NCI-N87/HGE.34	83
1. Morphologie cellulaire de la co-culture	83

2. Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes	87
E) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse HGE.20	90
1. Morphologie cellulaire	90
2. Marqueurs des jonctions cellulaires	90
3. Marqueurs de différenciation des cellules principales	92
4. Capacité de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives et modulation de celles-ci à post-confluence	94
5. Modulation de l'activité enzymatique par la laminine-1 et/ou le TGF β	97
IV. DISCUSSION	99
A) Localisation de la laminine-5 et des sous-unités des intégrines dans l'estomac fœtal humain en développement	99
B) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	104
C) Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes	109
D) Caractérisation d'un système de co-culture NCI-N87/HGE.34	111
E) Caractérisation de la lignée gastrique HGE.20	112
V. CONCLUSION	117
VI. REMERCIEMENTS	120
VII. BIBLIOGRAPHIE	122
VIII. LISTE DES PUBLICATIONS	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa : acide aminée

AGL : acide gras libre

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BSA : albumine sérique de bœuf (*bovine serum albumin*)

° C : degré Celsius

CCK : cholécystokinine

cm : centimètre

EGF : facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)

FBS : sérum bovin foetal (*fetal bovine serum*)

FITC : fluorescéine isothiocyanate

Hc : hydrocortisone

HCl : acide chlorydrique

HGE : épithélium gastrique humain (*human gastric epithelium*)

HGF : facteur de croissance hépatocytaire (*hepatocyte growth factor*)

HGL : lipase gastrique humaine (*human gastric lipase*)

HGM : mésenchyme gastrique humain (*human gastric mesenchyme*)

H⁺K⁺ATPase : pompe H⁺K⁺adénosine triphosphatase gastrique

hre : heure

IgG : immunoglobuline de type G

Ins : insuline

kb : kilobase

kD : kiloDaltons

KGK : facteur de croissance des kératinocytes (*keratinocyte growth factor*)

MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)

M : molaire

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

mm : millimètre

MUC-5 : mucine-5

MUC-6 : mucine-6

OCT : *optimum cutting temperature compound*

PAS : acide périodique de Schiff (*periodic acid Schiff*)

PBS : tampon phosphate salin (*Phosphate Buffured Saline*)

Pg : pepsinogène

RGL : lipase gastrique de lapin (*rabbit gastric lipase*)

sc : sous-confluence

sec : seconde

sem : semaine

SDS : dodécylsulfate sodique

SDS-PAGE : gel d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate sodique

· TGF α : facteur de croissance transformant α (*transforming growth factor α*)

TGF β : facteur de croissance transformant β (*transforming growth factor β*)

U : unité

μg : microgramme

μl : microlitre

μm : micromètre

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : L'estomac et ses régions	4
Figure 2 : La glande gastrique	5
Figure 3 : Autorégulation de HGL	16
Figure 4 : Expression et distribution de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5 dans la muqueuse gastrique en développement	49
Figure 5 : Expression et distribution de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	51
Figure 6 : Expression et distribution de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	53
Figure 7 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	54
Figure 8 : Distribution comparative de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la muqueuse gastrique en développement	56
Figure 9 : Co-localisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la muqueuse gastrique fœtale	58
Figure 10 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	59
Figure 11 : Expression et distribution des sous-unités $\alpha 5-\alpha 7B$ et αv des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	61

Figure 12 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement	64
Figure 13 : Morphologie cellulaire de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	65
Figure 14 : Expression et distribution des récepteurs de facteurs de croissance dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	67
Figure 15 : Expression et distribution des sous-unités des intégrines dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	69
Figure 16 : Expression et distribution des marqueurs de jonctions cellulaires dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	71
Figure 17 : Expression des marqueurs de différenciation des cellules à mucus et des cellules pariétales dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	73
Figure 18 : Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	75
Figure 19 : Niveau de synthèse/sécrétion des enzymes digestives dans les lignées gastriques cancéreuses	76
Figure 20 : Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87	78
Figure 21 : Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87	79
Figure 22 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence	81

Figure 23 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence	82
Figure 24 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à post-confluence	84
Figure 25 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à post- confluence	85
Figure 26 : Morphologie cellulaire d'une co-culture de NCI-N87 et de fibroblastes gastriques foétaux	86
Figure 27 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques foétaux	88
Figure 28 : Effet des facteurs sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques foétaux	89
Figure 29 : Morphologie cellulaire de la nouvelle lignée gastrique cancéreuse HGE.20 clonée à partir de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87	91
Figure 30 : Expression et distribution des marqueurs de jonctions cellulaires dans la lignée HGE.20	91
Figure 31 : Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse HGE.20	93

Figure 32 : Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20	95
Figure 33 : Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20	96
Figure 34 : Effet de la laminine-1 et/ou du TGF β 1 sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives dans la lignée gastrique HGE.20	98

**Caractérisation et application de lignées gastriques épithéliales pour
l'étude de la régulation des fonctions digestives de l'estomac humain**

par

Mélissa Chénard

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc) en biologie cellulaire, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec

RÉSUMÉ

Chez l'humain, les cellules glandulaires principales co-expriment le pepsinogène fundique (Pg-5) et la lipase gastrique (HGL), respectivement impliqués dans la protéolyse et l'initiation de la lipolyse des triglycérides en acides gras. L'hypothèse de travail qui supporte mes travaux est que le maintien et/ou la différenciation fonctionnelle des fonctions digestives de l'épithélium gastrique est régulé par les facteurs de croissance et les constituants de la matrice extracellulaire.

Afin de définir les implications et les rôles possibles des protéines de la matrice extracellulaire formant la membrane basilaire, j'ai complété la localisation des laminines dans l'estomac humain en développement. En outre, la distribution des récepteurs de type intégrine permettant la liaison aux laminines fut déterminée de façon approfondie à différents stades de la morphogénèse épithéliale. Ainsi, au niveau du corps et de l'antré pylorique,

les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 1$ des intégrines sont retrouvées de façon ubiquiste dans l'épithélium gastrique en développement. Les sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 4$ des intégrines et la chaîne $\alpha 3$ des laminines sont concentrées à la surface des glandes ainsi qu'au niveau du fovéolus. La sous-unité $\alpha 2$ des intégrines possède un patron d'expression plus complexe : (1) elle est localisée à la base et aux zones de contacts cellule-cellule de l'épithélium de surface et fovéolaire, (2) elle est spécifiquement absente dans les cellules pariétales, (3) son expression augmente dans les glandes matures où elle se concentre au pôle basal des cellules épithéliales qui démontrent simultanément une forte réactivité pour la chaîne $\alpha 2$ de la laminine-2. Ces observations amènent de nouvelles évidences suggérant que les laminines et leurs récepteurs de type intégrine jouent un rôle dans le développement des différents types cellulaires gastriques.

Dans un deuxième temps, mon projet consistait à caractériser la nouvelle lignée gastrique cancéreuse NCI-N87. Ce thème représente l'aboutissement des recherches effectuées dans notre laboratoire pour mettre au point un modèle cellulaire qui soit : (1) indépendant de la disponibilité des tissus foetaux et, (2) représentatif de l'épithélium gastrique glandulaire puisqu'il n'existe pas à l'heure actuelle de lignée gastrique normale. Contrairement aux lignées gastriques cancéreuses utilisées couramment (AGS, Hs746t, KATO-III), la lignée NCI-N87 forme une monocouche cohérente, exprime la cadhérine-E ainsi que ZO-1 dans une sous-population. L'intégrité et la morphologie épithéliale de la monocouche sont maintenues

jusqu'à 20 jours post-confluence. La monocouche est PAS-positive et elle exprime la mucine-6 suggérant un phénotype mucopeptidique. La synthèse et la sécrétion de HGL (49 kD) et du Pg-5 (34 kD) sont significatives. L'addition du facteur de croissance épidermique (EGF) aux cultures cellulaires module l'activité de HGL sans affecter celle de PG-5. De plus, l'addition d'EGF sur une co-culture fibroblastes gastriques/NCI-N87 reproduit la modulation observée en culture d'explants et en culture primaire. Ces résultats mettent en évidence le potentiel du système de co-culture pour l'étude de la régulation du gène de HGL.

Finalement, puisque la lignée NCI-N87 exhibe un caractère multipotentiel de différenciation (marqueurs associés à plusieurs types épithéliaux gastriques), la mise au point (clonage) de la nouvelle lignée nommée HGE.20 a été effectuée. C'est la première lignée gastrique cancéreuse à posséder les caractéristiques d'une monocouche polarisée, tel que le suggère la présence de jonctions apicales spécialisées. Celle-ci pourrait éventuellement servir de modèle pour élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués (1) dans la régulation des fonctions épithéliales gastriques (2) et dans la régulation de la différenciation des divers types cellulaires gastriques.

I. INTRODUCTION

A) Avant-propos

L'épithélium gastrique exerce de nombreuses fonctions. En plus de jouer un rôle intrinsèque dans le maintien, la régénération et la restitution épithéliales, il agit comme barrière protectrice contre les micro-organismes envahisseurs et l'acidité du milieu. L'épithélium gastrique a également un rôle de premier plan à jouer en ce qui a trait aux fonctions digestives du tractus gastro-intestinal. Le bon fonctionnement de ces fonctions digestives est primordial afin d'assurer une bonne croissance et un bon développement chez l'humain. Au cours des dernières années, plusieurs études ont permis d'approfondir nos connaissances sur ce sujet. Toutefois, il n'en demeure pas moins que très peu de choses sont connues sur les mécanismes régulant le développement fonctionnel du système digestif humain.

Étant capable de synthétiser et de sécréter divers composés (mucus, pepsinogène, lipase gastrique), l'estomac occupe une grande place dans la digestion chez l'humain. Ainsi, alors que le pepsinogène (Pg) rend possible la digestion des protéines, la lipase gastrique humaine (HGL) permet d'entamer la digestion des lipides de manière à faciliter l'hydrolyse subséquente des triglycérides par la lipase pancréatique. L'importance de cette dernière fonction est accrue dans les cas d'insuffisance pancréatique physiologique (nouveau-né) (Lee et al., 1993) ou pathologique (alcoolisme chronique, fibrose

kystique) (Abrams et al., 1984, 1987) car la synthèse/sécrétion de lipase gastrique peut compenser, du moins en partie, pour les faibles niveaux de lipase pancréatique (Gargouri et al., 1986). Ainsi, il devient alors très important de bien comprendre les mécanismes qui vont permettre de réguler le développement et l'expression de la lipase gastrique chez l'humain.

Jusqu'à maintenant, l'utilisation de modèles animaux, plus particulièrement les rongeurs, a permis d'identifier certains modulateurs ayant un rôle à jouer dans le développement morphologique et fonctionnel de la muqueuse gastrique. Cependant, ces modèles ne sont d'aucune utilité pour l'étude de la régulation de la lipase gastrique ou pour l'étude de la différenciation fonctionnelle des cellules zymogéniques (cellules principales), puisque les rongeurs possèdent plutôt une lipase d'origine linguale (Hamosh, 1990). Ainsi, les caractéristiques physiologiques des cellules principales de rongeurs, produisant le pepsinogène seulement, ne sont pas représentatives de la situation chez l'humain où lipase et pepsinogène sont produits par ce type cellulaire. Pour contourner ce problème, la mise au point de la méthode de culture organotypique d'explants d'estomac fœtal humain ainsi que la mise au point de la méthode de culture primaire d'épithélium gastrique a permis d'entamer l'étude des mécanismes de régulation spécifiques de la synthèse et de la sécrétion de la lipase gastrique humaine. Cependant, l'utilisation de tissus fœtaux est un facteur limitant pour effectuer des études exhaustives sur ces mécanismes de régulation. Il devient alors important de trouver un modèle cellulaire alternatif qui pourrait permettre de disséquer

expérimentalement les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation de la lipase gastrique humaine. C'est dans cette optique que nous avons entrepris dans notre laboratoire de caractériser le statut fonctionnel de certaines lignées gastriques cancéreuses (AGS, Kato-III, Hs746t, NCI-N87) puisqu'il n'existe pas de lignée gastrique normale.

B) L'estomac

Les organes du tube digestif sont divisés en deux grandes catégories: les segments du tube digestif proprement dit et les organes annexes. L'estomac fait partie de la première catégorie tout comme l'intestin grêle et le côlon (Marieb, 1993). D'un point de vue anatomique, l'estomac se divise en quatre régions distinctes (figure 1). Ainsi, à la jonction oesophage-estomac, on retrouve le cardia alors qu'au niveau supérieur de la grande courbure, on aperçoit la région du fundus. La région prépondérante de l'estomac se nomme le corps et elle est située dans la portion médiane de l'estomac. Finalement, on retrouve la région de l'antrum pylorique au niveau de la jonction estomac-duodénum. Cette dernière région est parfois appelée pylore ce qui constitue une erreur puisque le pylore est en fait le sphincter musculaire situé à ce niveau. La muqueuse qui tapisse l'intérieur de l'estomac est composée d'un épithélium simple organisé en unités fovéolus-glande également appelées glandes gastriques (Marieb, 1993). Les glandes gastriques sont les structures digestives fonctionnelles de l'estomac puisqu'elles sont

responsables de la sécrétion de l'acide chlorhydrique (HCl) ainsi que des enzymes digestives (Stevens et Lowe, 1992).

Figure #1 : L'estomac et ses régions

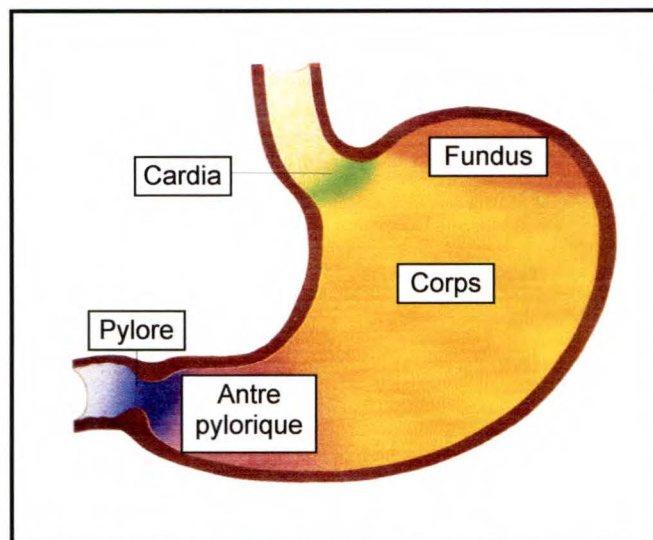


Figure 1 : Localisation des 4 régions anatomiques de l'estomac : le cardia, le fundus, le corps et l'antre pylorique.

C) La glande gastrique

Les glandes gastriques sont divisées en quatre compartiments successifs (figure 2). De la surface vers le fond de la glande, on retrouve tout d'abord le foveolus qui est suivi de l'isthme et du collet pour se terminer avec la base de la glande.

Figure #2 : La glande gastrique

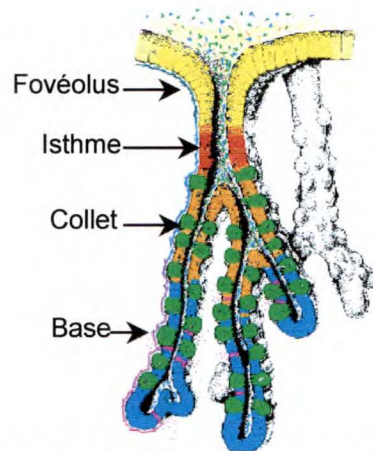


Figure 2 : Localisation des différents compartiments composant la glande gastrique : le **fovéolus**, l'**isthme**, le **collet** et la **base** de la glande.

D) Les types cellulaires gastriques et leurs fonctions

Chacun des compartiments de la glande gastrique est constitué de différents types cellulaires ayant des fonctions spécialisées. C'est au niveau de l'isthme que l'on retrouve les cellules souches de la glande gastrique (Karam et Leblond, 1992). Leurs cellules filles migrent le long de l'axe foveolus-glande de manière ascendante ou descendante. Cette migration bidirectionnelle des cellules constitue une caractéristique importante de l'estomac en comparaison à l'intestin où les cellules migrent principalement de manière ascendante de la crypte vers le sommet de la villosité (Karam et Leblond, 1995). Au niveau du foveolus, on retrouve principalement des cellules à mucus de surface (Karam et Leblond, 1992) dont la principale fonction est la synthèse/sécrétion de mucine-5 (MUC-5; Ho et al., 1995). Ce produit formera une barrière physique protectrice contre les micro-organismes et l'acide gastrique. Le foveolus contient quelques cellules pariétales bien

qu'elles soient concentrées dans les régions du collet et de la base de la glande (Karam et Leblond, 1992). La fonction des cellules pariétales consiste à sécréter l'acide chlorhydrique qui permettra de stériliser le bol alimentaire et de cliver le pepsinogène en sa forme active : la pepsine (Marieb, 1993). Dans la région du collet, on compte une bonne proportion de cellules à mucus (Karam et Leblond, 1992). Contrairement aux cellules à mucus de surface qui expriment MUC-5, les cellules à mucus du collet synthétisent et sécrètent la mucine-6 (MUC-6; Ho et al., 1995). Finalement, à la transition collet-base on retrouve des cellules pré-zymogéniques alors que les cellules principales matures sont localisées un peu plus vers le bas de la glande. On peut également observer quelques cellules entéro-endocrines dispersées dans la région basale (Karam et Leblond, 1992).

E) Spécialisation des glandes gastriques

Bien que la muqueuse gastrique soit organisée en unités fovéolus-glande dans toutes les régions de l'estomac, la morphologie de ces unités est spécialisée selon leur localisation anatomique. Ainsi, au niveau du cardia et de l'antrum, le fovéolus est très allongé (Stevens et Lowe, 1992) ce qui est conforme avec le rôle principal de ces deux régions dans la protection de l'acidité du milieu via une synthèse/sécrétion abondante de mucus. Les cellules pariétales et principales sont donc peu nombreuses ou tout simplement absentes dans les unités fovéolus-glande de ces deux compartiments (Stevens et Lowe, 1992). Pour ce qui est de la région du

fundus, et plus particulièrement du corps, la portion glandulaire est prépondérante (Stevens et Lowe, 1992) puisque le rôle de ces régions est d'entamer la digestion chimique des aliments. Ainsi, au niveau du corps et du fundus, les cellules pariétales et principales sont nombreuses ce qui permet une sécrétion élevée d'acide chlorhydrique ainsi qu'une synthèse/sécrétion accrue d'enzymes nécessaires à la digestion. Le nombre important de cellules principales retrouvées dans le corps et le fundus font de ces deux régions des cibles de choix pour l'étude des fonctions digestives.

F) Différenciation des cellules principales

Le pepsinogène et la lipase gastrique humaine sont les deux zymogènes retrouvés dans l'estomac. Ce sont les cellules principales qui sont responsables de leur synthèse et de leur sécrétion. Ce type cellulaire est particulier en comparaison avec les autres types de cellules retrouvés dans l'estomac puisqu'il est généré suite à une trans-différenciation que subissent les cellules à mucus du collet (Karam et Leblond, 1995). Ainsi, une fraction des cellules souches de l'isthme produisent des précurseurs des cellules du collet. Ces dernières génèrent à leur tour deux types cellulaires pré-différenciés, soit une minorité de cellules pré-pariétales et une majorité de cellules pré-collet qu'on retrouve au niveau inférieur de l'isthme. Du fait que ce type cellulaire est mitotiquement actif, il peut générer de nouvelles cellules pré-collet ou se différencier en cellules du collet capables de synthétiser et de sécréter du mucus. Les cellules du collet ainsi différenciées poursuivent leur

migration vers la base de la glande et subissent une transdifférenciation. Au cours de cette migration, l'appareil sécrétoire des cellules se spécialise progressivement : le pepsinogène s'accumule dans de petites vésicules en plus des grains de mucus habituels. Il y a donc apparition d'un nouveau type cellulaire, soit des cellules pré-zymogéniques possédant des granules intermédiaires. À ce stade, les cellules rappellent le statut de différenciation des cellules principales fœtales c'est-à-dire qu'elles contiennent des grains de pepsinogène, de lipase gastrique ainsi que des grains de mucine-6 (résultats non-publiés). Les cellules pré-zymogéniques ainsi produites poursuivent leur migration vers la base de la glande et graduellement, elles produisent de moins en moins de mucus pour finalement ne produire que du pepsinogène et ainsi devenir des cellules zymogéniques matures. Après une vie de plusieurs mois, les cellules principales dégénèrent progressivement et elles sont alors exfoliées au niveau de la lumière gastrique ou phagocytées par une cellule voisine.

G) Régulation de la différenciation des cellules principales

1. Effet des glucocorticoïdes

Jusqu'à présent, très peu de choses sont connues en ce qui concerne la régulation de la différenciation des cellules principales et ce, en particulier chez l'humain. En effet, la plupart des études ont été effectuées chez la souris et le rat. Chez ces espèces, il a été démontré que les glucocorticoïdes,

telle l'hydrocortisone (Hc), jouent un rôle dans la maturation cellulaire (Kumegawa et al., 1978; Tsukada et al., 1994). Ainsi, suite à l'administration d'hydrocortisone chez des souriceaux en développement (5 jours), une différenciation morphologique précoce des cellules principales a été observée. Ce traitement a pour effet d'augmenter la quantité de granules zymogéniques, la proportion de réticulum endoplasmique rugueux ainsi que l'activité pepsine à des niveaux comparables à ceux mesurés chez l'adulte. De plus, si lors des injections on combine l'hydrocortisone avec la thyroxine, cette différenciation est accentuée.

Les mécanismes par lesquels les glucocorticoïdes induisent la différenciation des cellules principales ne sont pas encore très clairs. Cependant, on pense que ces derniers permettraient seulement d'accélérer le processus de différenciation en mettant en place de manière précoce un programme de développement pré-existant (Kumegawa et al., 1978). Pour ce qui est de la thyroxine, il a été démontré que son rôle dans la maturation des cellules principales était indirect puisque cette dernière permettrait d'augmenter les glucocorticoïdes sériques en stimulant les glandes surrénales (Tseng et Johnson, 1986).

2. Effet de la matrice extracellulaire et des récepteurs de type intégrine

Les laminines sont des constituants exclusifs de la lame basale, un arrangement spécialisé de la matrice extracellulaire à l'interface de

l'épithélium et du mésenchyme. Ce sont des glycoprotéines d'adhésion composées de trois chaînes, soit une chaîne longue nommée α et deux chaînes courtes nommées β et γ . Les laminines interagissent avec plusieurs constituants de la lame basale tels le collagène IV et des glycosaminocans. De plus, elles lient divers récepteurs exprimés par les cellules épithéliales, soit les récepteurs de type intégrine. Les intégrines sont formées de deux sous-unités : alpha et beta. Ce sont des protéines transmembranaires pouvant lier des constituants spécifiques de part et d'autre de la membrane. La sous-unité α reconnaît une séquence spécifique du ligand du côté extracellulaire alors que la sous-unité β se lie du côté intracellulaire au cytosquelette via la taline et /ou l' α -actinine pour ne nommer que ces deux molécules (Alberts et al., 1994). Sur le plan fonctionnel, les intégrines permettent l'adhésion et la polarisation des cellules via la formation de liens physiques transmembranaires entre la matrice et le cytosquelette. En outre, elles activent une variété de signaux intracellulaires impliqués dans la régulation génique (prolifération, différenciation, survie) coopérant ainsi avec les hormones et les facteurs de croissance.

Au cours des dernières années, l'implication de la matrice extracellulaire et des récepteurs de type intégrine dans le développement de l'intestin grêle humain a été clairement démontrée (Beaulieu, 1997). Ainsi, une déposition de laminine-1/10 coordonnée avec une expression de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ au niveau de la villosité chez l'adulte permettrait l'induction et/ou le maintien de la différenciation entérocytaire (Basora et al., 1997) tout

comme une présence partiellement coordonnée de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et de la laminine-5 (Beaulieu, 1997). Finalement, une localisation de laminine-2 le long de la crypte serait possiblement responsable du développement glandulaire (Perreault et al., 1995).

Dans l'estomac, étant donné la distribution restreinte de la chaîne $\alpha 2$ de la laminine-2 au niveau de l'épithélium glandulaire (isthme-collet-base), il semblerait que la laminine-2 joue un rôle clé dans la migration descendante ou dans la différenciation des différents types cellulaires retrouvés à la base de la glande (Tremblay et Ménard, 1996). De plus, chez l'adulte, il a été proposé que les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ agiraient de concert avec les laminines-1/10 et 5 afin de médier la différenciation des cellules de surface alors que l'expression d' $\alpha 6\beta 1$ en coopération avec l'expression de la laminine-2 et/ou laminine-1/10 permettrait une différenciation glandulaire (Virtanen et al., 1995). Évidemment, cette hypothèse n'exclut pas le rôle possible d'autres laminines ou constituants de la matrice extracellulaire dans la régulation de la différenciation.

H) Localisation des zymogènes gastriques

Le rôle des cellules principales est de synthétiser et de sécréter les zymogènes gastriques. Le zymogène gastrique le plus connu est sans aucun doute le pepsinogène qui, une fois clivé, génère la forme active de cette enzyme protéolytique : la pepsine. Chez l'espèce humaine, un deuxième

zymogène est également synthétisé par les cellules principales : la lipase. La présence de lipase gastrique dans l'estomac n'est pas caractéristique de toutes les espèces. En effet, chez les rongeurs par exemple il n'y a pas de trace de lipase gastrique, celle-ci étant plutôt remplacée par une lipase d'origine linguale qui permet d'entamer la phase pré-duodénale d'hydrolyse des lipides (Hamosh, 1990).

Chez les autres espèces où il y a présence de lipase gastrique, il n'en demeure pas moins qu'il y a une grande différence avec l'espèce humaine : sa localisation. Par exemple, chez les espèces félines et canines, le pepsinogène est retrouvé au niveau des cellules principales situées à la base des glandes fundiques alors que la lipase gastrique est localisée au niveau des cellules à mucus du fovéolus donc vers la surface de la glande. De plus, aucune co-localisation n'a été rapportée au niveau de la muqueuse fundique (Carrière et al., 1992). Chez le lapin, il a été démontré que le pepsinogène et la lipase (RGL) sont tous deux présents au niveau du cardia mais chacun dans des populations zymogéniques distinctes. Ainsi, les cellules qui produisent le pepsinogène sont retrouvées à la base des glandes alors que celles qui produisent la lipase (RGL) sont plutôt localisées dans le haut de ces mêmes glandes (Bernadac et al., 1991). Dans la muqueuse gastrique humaine, il existe une co-localisation stricte des deux zymogènes au niveau des mêmes cellules principales. En effet, lipase (HGL) et pepsinogène sont immunolocalisés dans les mêmes grains des cellules principales et sont donc retrouvés au niveau de la base de la glande (Moreau et al., 1988; Ménard et

Basque, 2001). Ainsi, alors que le pepsinogène est synthétisé et sécrété par les cellules principales situées à la base des glandes chez toutes les espèces étudiées, la lipase possède une distribution propre à chacune des espèces et c'est seulement chez l'humain qu'il existe une co-localisation de ces deux zymogènes.

I) La lipase gastrique humaine

1. Ses caractéristiques

C'est en 1982 que l'on a isolé et purifié pour la toute première fois une lipase d'origine gastrique (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982). Suite à cette purification, des études biochimiques et moléculaires ont été réalisées afin de caractériser cette nouvelle enzyme. On a donc pu établir que le gène encodant pour la lipase gastrique humaine était composé de 10 exons, séparés de 9 introns et qu'il représente environ 14 kb de l'ADN génomique. De ces 10 exons, seulement 9 sont transcrits afin de générer une protéine de 379 aa (Lohse et al., 1997). On dénombre 4 sites potentiels de glycosylation sur la protéine ce qui lui donne un poids moléculaire d'environ 49 kD (Bodmer et al., 1987). La lipase gastrique humaine possède un pont disulfure qui est absolument essentiel pour son activité catalytique (Gargouri et al., 1988). De plus, des analyses de la séquence du gène ont démontré qu'il existe un tétrapeptide en N-terminal essentiel pour la liaison de l'enzyme à son substrat : les lipides (Bernback et Blackberg, 1989).

La lipase gastrique humaine fait partie de la famille des lipases pré-pyloriques aussi appelées lipases acides (Gargouri et al., 1989) et pour cause puisque son pH optimum est d'environ 5.3 (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982). Cette famille de lipase possède une structure stéréochimique stable. Ceci est particulièrement vrai pour HGL car des études ont démontré que celle-ci demeurerait active après une incubation de 2 heures à un pH de 1 (Moreau et al., 1988). Contrairement aux lipases basiques, la famille des lipases acides agit sans l'aide de cofacteurs ni sels biliaires contrairement à la lipase pancréatique (Hamosh et Hamosh, 1989).

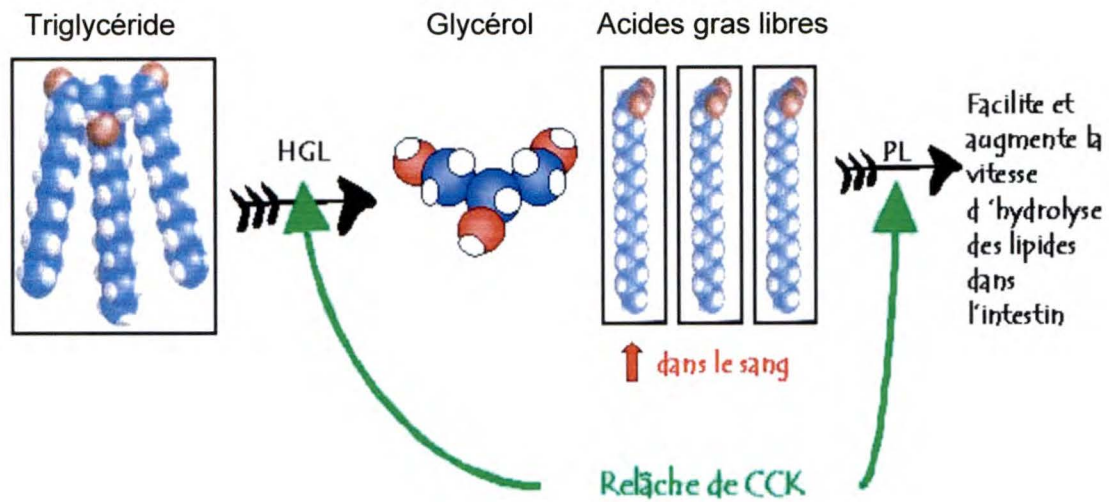
2. Son rôle en général

La lipase gastrique humaine est un enzyme faisant partie d'une classe spéciale d'estérases puisqu'elle est capable d'hydrolyser un substrat, le triacylglycérol, en une forme insoluble soit en glycérol et en acides gras libres (AGL) (Gargouri et al., 1989). *In vitro*, HGL démontre une haute spécificité pour l'hydrolyse des chaînes courtes alors qu'*in vivo* ce sont plutôt les chaînes longues du triacylglycérol alimentaire qui sont préférentiellement clivées (Hamosh, 1984). Cette différence de spécificité a été expliquée par l'équipe de Verger en 1986 après qu'il eu étudié l'activité lipase en fonction du pH. Cette étude a permis de démontrer que l'activité spécifique maximale pour l'hydrolyse des substrats à chaînes courtes était atteinte à pH 6.0 alors que le pH optimum pour l'hydrolyse des chaînes longues était situé entre 4.5 et 5.5,

condition normalement retrouvée *in vivo* (Gargouri et al., 1986b). De plus, il a été démontré *in vivo* que ce sont principalement les chaînes en position sn-1 et sn-3 qui sont clivées par la lipase gastrique humaine (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982).

2.1 Son rôle chez un sujet normal

Bien que la lipase gastrique humaine ne soit pas essentielle chez un adulte normal, elle permet toutefois d'optimiser l'activité de la lipase pancréatique au niveau du duodénum. Cette optimisation est possible suite à une relâche de cholécystokinine (CCK) qui est causée par l'augmentation des acides gras dans le sang. Cette augmentation d'AGL fait suite à l'hydrolyse des triacylglycérols par la lipase gastrique humaine. La relâche de CCK favorise à son tour la synthèse/sécrétion de lipase gastrique et de lipase pancréatique (figure 3). De plus, il a été démontré que la relâche d'acides gras libres dans l'estomac facilite l'action subséquente de la lipase pancréatique dans l'intestin. En effet, il a été démontré *in vitro* que si on pré-incubait une solution lipidique avec de la lipase gastrique à pH acide, cela avait pour conséquence de diminuer de manière très significative le temps de latence de la lipase pancréatique (Gargouri et al., 1986). Ainsi, l'un des principaux rôles de la lipase gastrique chez un adulte normal est d'agir en synergie avec la lipase pancréatique afin de faciliter et d'augmenter la vitesse d'hydrolyse des lipides au niveau de l'intestin (Hamosh M., 1990).

Figure #3 : Autorégulation de HGL**Figure 3** : Schéma illustrant le rôle de la lipase gastrique (HGL) et des acides gras libérés dans l'optimisation de la lipolyse gastrique (auto-régulation positive) et l'optimisation de la lipolyse intestinale médiée par la lipase pancréatique (PL).

2.2 Son rôle chez le nouveau-né

Chez le nouveau-né, le rôle de la lipase gastrique humaine est d'une importance capitale. Elle pénètre à l'intérieur des globules lipidiques du lait, initiant l'hydrolyse des lipides contenus (30 à 60 %) (Hamosh, 1994), ce que ne peut faire la lipase pancréatique ni la lipase digestive du lait. La lipolyse ainsi amorcée est un pré-requis pour l'action subséquente de la lipase digestive du lait et de la lipase pancréatique (Cohen et al., 1971; Kirk et Hamosh, 1991). De plus, il semblerait que la lipolyse gastrique est un bon mécanisme compensatoire pour les faibles niveaux de lipase pancréatique néo-natal. Finalement, il a été démontré que les chaînes d'acides gras de longueur moyenne libérées dans l'estomac peuvent y être directement

absorbées ce qui contribue à fournir une source d'énergie pour le nouveau-né (Hamosh, 1990).

2.3 Son rôle dans les cas d'insuffisance pancréatique pathologique

La lipase gastrique humaine est également d'une grande importance dans les cas d'insuffisance pancréatique pathologique causée par exemple par la fibrose kystique et l'alcoolisme chronique. Chez les individus souffrant d'insuffisance pancréatique, la lipolyse gastrique est maintenue à des niveaux normaux. Cependant, la lipolyse effectuée par HGL au niveau de l'estomac se poursuit de façon sous-optimale au niveau du duodénum. Ainsi, dans les cas d'insuffisance pancréatique, l'activité des lipases pré-duodénales contribue à la digestion et à l'absorption de 50 à 70 % du gras alimentaire comparativement à des niveaux se situant au environ de 30 à 60 % chez un adulte sain (Hamosh, 1990).

J) Ontogénèse des zymogènes gastriques

L'activité de la lipase gastrique humaine est établie très tôt au cours du développement. En effet, des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré qu'il y a présence de lipase gastrique dans des estomacs fœtaux humains dès l'âge de 10 semaines de gestation et que l'activité de celle-ci augmente jusqu'à l'âge de 20 semaines pour atteindre des niveaux représentant 30 % de l'activité lipase adulte (Ménard et al., 1995). Chez les

enfants prématurés, il a également été démontré que l'activité lipase augmente jusqu'à l'âge de 30-32 semaines de gestation où elle atteint un maximum, pour ensuite diminuer à des niveaux plus faibles jusqu'au moment de la naissance (Lee et al., 1993). Après la naissance, il a été observé que l'activité lipase demeure relativement constante entre les âges de 3 mois à 26 ans (Dipalma et al., 1991) et que ce n'est que chez les personnes de 60 ans et plus qu'on observe une chute de l'activité lipase (Moreau et al., 1988; Abrams et al., 1988). Pour ce qui est de l'activité pepsine, il a été démontré qu'elle est détectable vers 14-15 semaines de gestation et que, contrairement à HGL, celle-ci demeure constante et relativement faible au cours du développement (Ménard et al., 1995). Ainsi, ce n'est qu'après la naissance que les niveaux de pepsine augmentent pour atteindre ceux retrouvés chez l'adulte.

L'activité de la lipase gastrique humaine n'est pas répartie de manière uniforme dans l'estomac. En effet, c'est dans la région du fundus que l'activité lipase est prépondérante. Ainsi chez l'adulte, on peut remarquer un gradient décroissant d'activité allant du haut de la grande et de la petite courbure vers la portion inférieure de la grande et de la petite courbure (Hamosh et Hamosh, 1989). Des données obtenues dans notre laboratoire ont permis d'établir que cette localisation régionale de la lipase gastrique humaine était établie dès l'âge de 16 semaines de gestation (Ménard et al., 1995). Quant à la pepsine, des études effectuées chez des biopsies d'estomacs humains ont permis d'établir que l'activité pepsine chez l'adulte est considérable au niveau de

l'antré pylorique mais que c'est au niveau du corps de l'estomac que l'on retrouve les niveaux les plus élevés d'activité pepsine (Dipalma et al., 1995). La localisation régionale de la pepsine ne semble pas être établie aussi tôt que celle de la lipase lors du développement *in utero*. En effet, il a été démontré qu'à 20 semaines de gestation les niveaux prépondérants de pepsine se situent au niveau de l'antré pylorique et non du corps de l'estomac (Ménard et al., 1995).

Des études portant sur la localisation de l'activité zymogénique au cours du développement *in utero* ont permis d'établir que, chez des estomacs fœtaux, la localisation régionale de la lipase gastrique est en place dès l'âge de 16 semaines de gestation. De son côté, la localisation de la pepsine n'est pas encore établie à 20 semaines de gestation. En effet, à cet âge c'est au niveau de l'antré pylorique et non du corps de l'estomac que les niveaux de pepsine sont prépondérants (Ménard et al., 1995).

K) Régulation de la sécrétion des zymogènes gastriques

Les zymogènes gastriques sont sécrétés très tôt lors du développement fœtal. Alors qu'un bon nombre d'études ont été effectuées afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la sécrétion du pepsinogène, très peu de choses sont connues sur la sécrétion de la lipase gastrique humaine. Ainsi, de nombreux résultats démontrent que la CCK et les carbachols favorisent la sécrétion du pepsinogène via une relâche de calcium

intracellulaire (Lanas et al., 1994; Chew et Hershey, 1982; Fiorucci et McArthur, 1990). Cependant, il semblerait que d'autres voies de signalisation intracellulaire seraient impliquées. En effet, des données indiquent que la stimulation β -adrénergique de la sécrétion de pepsinogène est médiée par une augmentation de cAMP intracellulaire (Hershey et al., 1983; Raufman et al., 1984; Lanas et al., 1994). Ainsi, la sécrétion du pepsinogène semble être régulée par au moins deux voies intracellulaires distinctes. Du côté de la lipase gastrique humaine, il a été démontré *in vitro* que la CCK ainsi que la pentagastrine avaient pour effet d'augmenter les niveaux de sécrétion de HGL (Hamosh, 1990). Cependant, alors que l'effet de la pentagastrine a été confirmé dans des études *in vivo* (Borovicka et al., 1997), on se questionne toujours sur l'implication véritable de la CCK *in vivo* (Wojdemann et al., 1997).

L) Régulation de l'expression du gène de la lipase gastrique

Jusqu'à tout récemment, les mécanismes cellulaires et moléculaires de régulation du gène de la lipase gastrique n'avaient été étudiés qu'en culture organotypique d'estomac fœtal humain. Dans un premier temps, il fut constaté que l'expression de la lipase *in utero* et en culture était régulée au niveau de l'ARN messenger (Tremblay et al., 1999). D'autres expériences ont démontré que l'addition du facteur de croissance épidermique (EGF) ou du facteur de croissance transformant α (TGF α) (100ng/ml) diminuait l'activité lipase tissulaire et les niveaux d'ARNm de moitié via une activation aiguë des kinases MAP (*mitogen-activated protein*) p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} et, possiblement,

d'autres effecteurs intracellulaires (Tremblay et al., 1997; 1999). Récemment, l'action répressive des *insulin-like growth factors* (IGFs) a aussi été reconnu (Tremblay et al., 2001). Il est important de noter que ces facteurs ne modulent pas sensiblement l'activité de la pepsine (Tremblay et al., 1997; 2001) ce qui démontre une fois de plus que les deux enzymes digestives produites par les cellules principales humaines sont régulées de manière différentielle, tel que suggéré par leurs patrons ontogéniques. L'effet d'EGF et l'implication de $p42^{\text{Erk-2}}/p44^{\text{Erk-1}}$ MAPK sur la synthèse/sécrétion de lipase gastrique humaine ont été confirmés sur des cultures primaires épithéliales (Basque et Ménard, 2000).

M) Les lignées gastriques cancéreuses comme modèle d'étude

Actuellement, les études sur la régulation de la synthèse et de la sécrétion des enzymes digestives sont réalisées chez des cultures d'explants et des cultures primaires de cellules épithéliales gastriques. Ces systèmes de culture comportent certaines limitations étant donné la faible disponibilité de spécimens humains et l'incapacité de faire des études de régulation et de différenciation à long terme. Il devient alors primordial de trouver un bon modèle cellulaire qui permettrait d'étudier de manière plus extensive les mécanismes contrôlant la synthèse/sécrétion de HGL et de Pg-5. Comme il n'existe pas de lignée gastrique normale, l'utilisation de lignées cellulaires épithéliales provenant de carcinomes gastriques semble être une bonne alternative pour approfondir ces études. Ainsi, des données préliminaires sur

trois lignées gastriques cancéreuses exhibant des phénotypes différents (AGS, Hs746t, KATO-III) suggèrent que ces trois lignées expriment des marqueurs communs tels des glycoconjugués PAS-positifs ainsi que les récepteurs de l'EGF et du facteur de croissance des kératinocytes (KGF). Cependant, des données en culture cellulaire ont démontré que les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique par ces cellules étaient très faibles en comparaison avec une muqueuse gastrique fœtale intacte. De plus, aucun substrat biologique (collagène, matrigel) ne semblait faciliter la différenciation cellulaire et la synthèse/sécrétion des enzymes digestives. Par conséquent, l'utilisation de ces trois lignées à titre de modèles expérimentaux pour l'étude de la différenciation des cellules épithéliales gastriques et pour l'étude de la régulation de la synthèse/sécrétion de HGL et Pg-5 apparaît limitée (Basque et al., 1997). Il faut donc poursuivre les recherches afin de trouver un bon modèle cellulaire qui serait représentatif des cellules normales retrouvées dans l'estomac.

Bien que les lignées AGS, Hs746t et la nouvelle lignée gastrique cancéreuse NCI-N87 soit tumorigénique chez la souris nue athymique, seule cette dernière origine d'un carcinome différencié (Park et al., 1990). De plus, certaines données morphologiques semblaient indiquer que cette lignée serait plus différenciée que les lignées étudiées précédemment puisqu'elle posséderait des jonctions apicales. Les jonctions apicales sont composées de jonctions serrées (*zonula occludens* positives pour ZO-1) et de jonctions adhérentes (*zonula adherens* positives pour cadhérine-E). Il est bien connu

que leur mise en place est essentielle pour l'établissement de la polarité cellulaire (axe apical-basal), de la fonction barrière étanche et des fonctions épithéliales tissu-spécifiques (transport vectoriel, sécrétion, absorption) (Alberts et al., 1994).

N) Plan expérimental du mémoire

Dans le but ultime de comprendre et de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant la synthèse et la sécrétion des zymogènes gastriques et plus particulièrement la lipase gastrique humaine, nous nous sommes engagés dans la recherche d'un bon modèle cellulaire qui soit représentatif de l'épithélium gastrique normal. Celui-ci pourrait donc permettre des études extensives et à long terme contrairement aux modèles généralement utilisés soit : les cultures d'explants et les cultures primaires qui sont des modèles limitants.

Dans un premier volet, nous avons entrepris de localiser les diverses sous-unités des intégrines dans la glande foétale en fonction de la topographie de la lame basale afin de vérifier si elles ne pouvaient pas avoir un rôle à jouer à titre de médiateur potentiel dans la différenciation des types cellulaires gastriques et/ou dans la régulation de la synthèse/sécrétion des enzymes digestives. En parallèle, nous avons complété la localisation des laminines au niveau de la lame basilaire dans l'estomac foetal.

Dans un second temps, nous avons entrepris la caractérisation de la nouvelle lignée gastrique cancéreuse NCI-N87 afin de vérifier son potentiel à titre de modèle cellulaire pour l'étude de la régulation des fonctions digestives gastriques. Pour ce faire, nous avons vérifié plusieurs paramètres dont son comportement en culture, la présence de différents récepteurs de facteurs de croissance et de jonctions spécialisées, différents marqueurs de différenciation ainsi que leur potentiel de synthèse et de sécrétion des enzymes gastriques.

Dans un troisième volet, nous avons étudié l'effet de plusieurs facteurs de croissance et hormones sur la synthèse/sécrétion des enzymes gastriques afin de vérifier si leurs effets mimaient ceux préalablement observés en culture d'explants et/ou en culture primaire d'épithélium. Les facteurs ou hormones étudiés furent l'EGF, le KGF, le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), l'insuline (ins), et l'hydrocortisone.

Quatrièmement, nous avons vérifié la capacité des fibroblastes à stabiliser la monocouche de cellules NCI-N87. De plus, nous avons évalué la synergie possible entre les cellules NCI-N87 et la monocouche de fibroblastes fœtaux dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion des zymogènes gastriques.

Finalement, nous avons entrepris le clonage de la lignée parentale NCI-N87 par l'approche dilution limite afin de créer une lignée possédant un phénotype stable et homogène. Évidemment, nous avons tenté de sélectionner le phénotype zymogénique et avons donc entrepris la caractérisation du nouveau clone afin de vérifier son potentiel expérimental.

II. Matériel et méthodes

A) Localisation tissulaire de la laminine-5 et des récepteurs de type intégrine

1) Obtention des spécimens

Les tissus gastriques fœtaux utilisés proviennent de 34 fœtus humains dont l'âge varie entre 8 et 22 semaines (sem) de gestation (post-fertilisation : les âges fœtaux sont estimés d'après la méthode de Streeter (1920)) suite à une interruption de grossesse normale élective. Aucun tissu n'est prélevé chez des sujets associés à une anomalie ou malformation fœtale connue. De plus, aucun tissu ne provient de cas reliés à une mort fœtale. Toutes les études effectuées à l'aide d'un de ces spécimens sont approuvées par le comité de déontologie sur l'utilisation des tissus humains du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.

Les estomacs sont prélevés et immergés dans le milieu de culture Leibovitz L-15 (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) à température ambiante (23°C). Le milieu de culture exempt de sérum contient 40 µg/ml de gentamycine (Novopharm Ltd, Toronto, Ontario, Canada) ainsi que 40 µg/ml de nystatin (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Le prélèvement du tissu et son utilisation

sont réalisés en deçà de 30 minutes. Suite à l'excision du cardia, région située au niveau de la jonction eosophage-estomac, les spécimens sont découpés en trois régions distinctes soit : le corps, le fundus ainsi que l'antré pylorique. Celles-ci sont ensuite rincées avec du milieu puis directement plongées dans de l'OCT (Optimum Cutting Temperature embedded compound; Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN) pour finalement être congelées dans l'azote liquide. Par la suite, des cryosections de 3 à 4 μm sont effectuées à l'aide d'un cryostat (Jung Frigocut 2800N; Leica Canada, St-Laurent, Québec, Canada). Les coupes ainsi obtenues sont déposées sur des lamelles de verre où elles sont séchées à l'air libre pendant 1 heure (hre) sur une plaque chauffante (37°C). Les coupes ainsi obtenues sont conservées à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2) Immunofluorescence indirecte

Les cryosections de tissus gastriques sont tout d'abord fixées pendant 5 min dans une solution d'acétone-chloroforme (1 :1) à une température de 4°C. Elles sont ensuite rincées trois fois 5 min dans du tampon phosphate salin (PBS; phosphate buffered saline). Vient ensuite une incubation d'une heure dans une solution de PBS contenant 0,1% de gélatine de poisson dans le but de bloquer les sites de liaison non-spécifiques ainsi que trois lavages de 5 min dans du PBS. Les échantillons sont par la suite incubés dans une chambre humide à

température ambiante pendant une heure avec l'anticorps primaire approprié dilué dans une solution de PBS contenant 2% d'albumine sérique bovine (BSA fraction IV, Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada). Les sections sont, une fois de plus, rincées trois fois 5 min à l'aide de PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à la fluorescéine-isothiocyanate (FITC), qui est lui aussi dilué dans une solution de PBS-BSA. Cette incubation est d'une durée de 45 min. L'étape suivante consiste en trois lavages de 5 min et elle est suivie d'une coloration au Bleu d'Evan (0,01% dans du PBS). Après avoir été lavées une dernière fois au PBS, les lames sont montées à l'aide d'une solution glycérol-PBS (9 :1) contenant 0,1% de paraphénylène diamine pour finalement être visualisées avec un microscope Reichert Polyvar 2 (Leica Canada, St-Laurent, Québec, Canada) équipé d'un système d'épifluorescence. Les photographies sont prises avec un film Kodak Tri-X Pan (400 ASA).

3) Anticorps utilisés

La laminine-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) est localisée via l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la chaîne $\alpha 3$ de cette laminine. L'anticorps est utilisé à une concentration 1 :100 et est fourni par le Dr R.E. Burgeson (Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA) (Marinkovich et al., 1992). Il est à noter qu'en réalité cet anticorps reconnaît également deux autres laminines *in vivo* soit : les laminine-6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$) et laminine-7

($\alpha 3\beta 2\gamma 1$). Ceci est dû au fait que toutes deux sont également composées de la sous-unité $\alpha 3$ et co-localisées *in vivo* avec la laminine-5.

La distribution tissulaire des différentes intégrines est analysée en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les sous-unités α ou β . Ainsi l'anticorps P1E6 (1 :200, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) a permis de détecter la sous-unité $\alpha 2$ (Wayner et Carter, 1987). Quant à P1B5, (1 :2000, Gibco BRL, Ontario, Canada) il a localisé la sous-unité $\alpha 3$ (Takada et al., 1988) alors que l'anticorps Ab16 (1 :100) fourni par le Dr S.K. Akiyama (Howard University Cancer center, Washington D.C.) a identifié la sous-unité $\alpha 5$ (Akiyama et al., 1989). La sous-unité $\alpha 6$ est localisée à l'aide de G0H3 (1 :200, Serotec Canada, Mississauga, Ontario, Canada) (Sonnenberg et al., 1987) alors que les sous-unités $\alpha 7A$ et B sont reconnues à l'aide d'anticorps fournis par le Dr E. Engvall (Burnham Institute, LaJolla, CA) (Collo et al., 1993 et Song et al., 1993). La sous-unité αv est localisée à l'aide de l'anticorps VNR147 (1 : 200, Gibco BRL, Ontario, Canada) (Freed et al., 1989). De leur côté, les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 4$ sont analysées en utilisant les anticorps Ab13 (1 :25, Dr S.K. Akiyama) (Akiyama et al., 1989) et 3E1 (1 :5000, Calbiochem-Novabiochem international, San Diego, CA) (Phillips et al., 1994) respectivement. Finalement, un anticorps monoclonal de souris a permis de visualiser la sous-unité α de la pompe gastrique $H^+K^+ATPase$ (1 :800, HK 12.18, Calbiochem-Novabiochem international, San Diego, CA) (Fain et al., 1988) et d'identifier les cellules pariétales.

Les anticorps secondaires utilisés sont : un anti-lapin IgG FITC (dilution 1 :50), un anti-souris FITC (dilution 1 :30) puis un anti-rat FITC (dilution 1 :30). Ils sont tous obtenus chez Boehringer Mannheim Canada (Laval, Québec, Canada).

B) Caractérisation des modèles cellulaires

1) Lignées cellulaires

1.1) NCI-N87

La lignée épithéliale NCI-N87 (CRL-5822), isolée à partir d'un carcinome gastrique humain, est obtenue de la banque ATCC (Rockville, MD). Elle est propagée en présence de DMEM : F-12 (1 :1, Bio-média, Drummondville, Québec, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal (CELlect Gold FBS d'ICN, Montréal, Québec, Canada), 50 U/ml de pénicilline (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et 50 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada).

1.2) HGM.34

La lignée cellulaire HGM.34 (human gastric mesenchyme) constituée de fibroblastes gastriques humains a été isolée à partir d'explants d'estomac foetal humain de 18 semaines selon la technique utilisée précédemment pour l'intestin (Vachon et al., 1993). Après excision du muscle externe, on fait une digestion partielle à la trypsine (0,5% trypsine, 0,54 mM EDTA dans un tampon phosphate salin sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) pour une durée de 2 fois 10 min à 23°C. Les fragments restants sont déposés dans des pétris de 100 mm (10 fragments/pétri) et cultivés 12 hres à 37°C dans 1ml de DMEM supplémenté avec 10% FBS (CELlect Gold FBS d'ICN, Montréal, Québec, Canada), 50 U/ml de pénicilline, 50 ug/ml de streptomycine et 4 mM de glutamine. Le milieu est ensuite renouvelé (10ml) pour une durée de 48 heures. Après ces 48 heures, les fragments d'estomac sont enlevés à l'aide de pince puis le milieu est de nouveau changé. Les cellules fibroblastiques sont ensuite cultivées de 2 à 3 jours afin d'atteindre 60-70% de confluence. On fait ensuite une sous-culture avec 0,5% trypsine- 0,54 mM EDTA dans du PBS, 5 min à 23°C. Les cellules ainsi produites sont propagées en présence de DMEM : F-12 (1 :1, Bio-média, Drummondville, Québec, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal (CELlect Gold FBS d'ICN, Montréal, Québec, Canada), 50 U/ml de pénicilline (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et 50 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada).

1.3) HGE.20

La lignée cellulaire HGE.20 est obtenue à partir de la lignée cellulaire NCI-N87 suite à des clonages successifs tel que décrit à la section B, 8.2. Les cellules ainsi clonées sont propagées en présence de DMEM : F-12 (1 :1, Bio-média, Drummondville, Québec, Canada) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (CELlect Gold FBS d'ICN, Montréal, Québec, Canada), 50 U/ml de pénicilline (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et 50 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada).

2) Morphologie cellulaire en contraste de phase

La morphologie cellulaire est visualisée en contraste de phase à l'aide d'un microscope inversé IDO3 (Zeiss Canada) et les photographies sont prises sur des films Kodak T-MAX.

3) Microscopie électronique à balayage

Afin d'effectuer des études ultrastructurales sur une monocouche de NCI-N87, les cellules sont tout d'abord lavées avec du tampon cacodylate 0,1 M à 37°C (Electron Microscopy Sciences; Cederlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario) avant d'être fixées une première fois 15 min à

37°C dans une solution glutaraldéhyde 1,5% ((Electron Microscopy Sciences; Cederlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario)-cacodylate 0,1M, pH 7.2 puis une seconde fois à 4°C dans une solution glutaraldéhyde 2,5%-cacodylate 0,1 M, pH 7.2 pour 45 minutes. Les cellules sont ensuite lavées deux fois 15 minutes à 4°C toujours dans une solution de cacodylate 0,1M. Par la suite, les cellules sont post-fixées dans une solution d'osmium 2% pendant 2,5 heures à 4°C puis lavées 2 fois 15 minutes dans une solution de cacodylate 0,1M. Suivent des déshydratations successives à l'éthanol (30% à 100%) de 10 minutes chacune à température pièce. Une fois déshydraté, l'échantillon est séché selon la méthode de séchage par point critique (critical point drying). Finalement, l'échantillon est monté sur un support puis métallisé à l'or (pulvérisation) avant d'être observé à l'aide d'un microscopie électronique à balayage (microscope JEOL JSM-840A, Japon).

4) Immunofluorescence indirecte

4.1) Sous-unités des intégrines et de la pompe gastrique $H^+K^+ATPase$

Les études histochimiques sont effectuées *in situ* sur une monocouche de cellules NCI-N87. Ainsi, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre stériles et sont cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade de confluence désiré. Les spécimens sont fixés dans l'acétone-chloroforme (1 :1, 5 min) ou dans l'éthanol (10 min). Par la suite,

les cellules sont perméabilisées à l'aide de Triton X-100 (0,1% dans du PBS) pour 3 min. Le marquage non-spécifique est bloqué en utilisant une solution de PBS-BSA 0,2% pendant 10 min. Suit une incubation dans une chambre humide avec l'anticorps primaire (60 min) dilué dans une solution de PBS-BSA 2%. L'anticorps secondaire, conjugué à la fluorescéine-isothiocyanate, est également dilué dans du PBS-BSA 2% et est ensuite ajouté pour une durée de 45 min. Notez que les cellules sont lavées trois fois 5 min entre chacune de ces étapes. Finalement, les lamelles sont montées sur des lames à l'aide de glycérol : PBS (9 :1) pour enfin être observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Reichert Polyvar 2, Leica, St-Laurent, Québec, Canada). Les photos sont prises sur des films Kodak Tri-X Pan (ASA 400).

Les anticorps utilisés pour effectuer l'étude des diverses sous-unités des intégrines ainsi que pour l'étude de la sous-unité α de la pompe gastrique $H^+K^+ATPase$ sont les mêmes que pour l'étude faite sur le tissu foetal. Les dilutions employées sont également identiques (section A, 3).

4.2) Lipase gastrique et pepsinogène-5

Les études sont effectuées *in situ* sur une monocouche de cellules NCI-N87 ou de cellules HGE.20. Pour ce faire, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre stériles et sont cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence désirée. Les spécimens sont fixés 45

minutes dans une solution de formaldéhyde 1% diluée dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7.4. Afin de neutraliser les groupements aldéhydes, les cellules sont incubées 1 heure à 4°C dans un tampon 100mM glycine dans du PBS. Par la suite, les cellules sont perméabilisées à l'aide de Triton X-100 (0,1% dans du PBS) pour 3 min. Le marquage non-spécifique est bloqué en utilisant une solution de PBS-BSA 0,2% pendant 10 min. Suit une incubation dans une chambre humide avec l'anticorps primaire (60 min) dilué dans une solution de PBS-BSA 2%. L'anticorps polyclonal de lapin utilisé pour localiser la lipase gastrique humaine (HGL) est fourni par les Drs A. de Caro et R. Verger (Centre national de la Recherche Scientifique, Marseille, France). Il est utilisé à une dilution 1 :2000 (Moreau et al., 1989). L'anticorps polyclonal de cobaye servant à localiser le pepsinogène-5 est fourni par les Drs F. Carrière et R. Verger (Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France) et dilué 1 :150 (Moreau et al., 1989).

L'anticorps secondaire, conjugué à la fluorescéine-isothiocyanate, est également dilué dans du PBS-BSA 2% et est ensuite ajouté pour une durée de 45 min. Les anticorps secondaires sont respectivement un anti-lapin IgG (1 :30, Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada) pour la lipase et un anti-cobaye (1 :64, Sigma) pour la pepsine. Il est important de mentionner que les cellules sont lavées trois fois 5 min entre chacune de ces étapes. Pour terminer, les lamelles sont montées sur des lames à l'aide de glycérol : PBS (9 :1) pour enfin être observées à l'aide

d'un microscope à épifluorescence (Reichert Polyvar 2, Leica, St-Laurent, Québec, Canada). Les photos sont prises sur des films Kodak Tri-X Pan (ASA 400).

4.3) Récepteurs de facteurs de croissance

Les récepteurs de l'EGF (anticorps monoclonal LA1 de souris, utilisé à une concentration 1 :100, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, NY) (Shaw et al., 1991), du KGF (K-sam; anticorps polyclonal de lapin, utilisé à une dilution 1 :50, fourni par le Dr Masaaki Terada National cancer center research institute, Tokyo, Japon) (Hattori et al., 1990), du facteur de croissance hépatocytaire (HGF; c-met; anticorps polyclonal de lapin, utilisé à une dilution 1 :75, Santa Cruz Lab., Santa Cruz, CA) (Cooper et al., 1984), de l'IGF-I (anticorps monoclonal de souris α IR3, utilisé à une dilution 1 :50, Oncogene Science/ Canadian Bioclinical, Scarborough, Ontario, Canada) (Poretsky et al., 1985), du TGF β R-II (anticorps polyclonal de lapin #06-227, utilisé 1 :200, Upstate Biotechnology Inc, Lake Placide, NY) (Lin et al., 1992) ainsi que de l'insuline (anticorps polyclonal de lapin, utilisé 1 :100, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid NY) (Rosenzweig et al., 1990) sont localisés sur une monocouche de cellules NCI-N87 ou HGE.20. Alors que les récepteurs d'EGF, KGF, IGF-1 et de l'insuline sont localisés suivant la méthode décrite précédemment pour les sous-unités des intégrines (section B, 4.1), les récepteurs du HGF et du TGF β R-II sont,

quant à eux, identifiés suivant la méthode citée dans le section B, 4.2 pour l'identification de la lipase et de la pepsine.

Les anticorps secondaires utilisés lors de l'immunofluorescence indirecte, soit un anti-lapin IgG FITC ou un anti-souris FITC sont obtenus chez Boehringer Mannheim Canada (Laval, Québec, Canada) et utilisés à des dilutions de 1 :50 et 1 :30 respectivement.

4.4) Marqueurs des jonctions cellulaires

4.4.1) Zonulae adherens

La cadhérine-E est localisée utilisant la même méthode que pour les sous-unités des intégrines (section B, 3.1). L'anticorps utilisé (cl.36) est dilué 1 :800 dans du PBS-BSA 2% et provient de Transduction Laboratories, (Lexington, KT). L'anticorps secondaire est un anti-souris FITC utilisé à une dilution 1 :50 (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada). Notez que c'est l'éthanol qui est employé pour la fixation des cellules sur les lamelles.

4.4.2) Zonulae occludens

La protéine ZO-1, qui est un marqueur des jonctions étanches, est visualisée selon la technique décrite pour l'immunofluorescence de la

lipase et de la pepsine. (section B, 3.2). L'anticorps est utilisé à une dilution 1 :500, dans une solution de PBS-BSA 2%, et provient de Zymed Laboratories, (San Francisco, CA) (Tsarfaty et al., 1994). L'anticorps secondaire est un anti-lapin-FITC (1 :30, Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada).

4.5) Mucine-6

La mucine-6, qui est un marqueur des cellules à mucus du collet, a été visualisée selon la technique décrite pour l'immunofluorescence de la lipase et de la pepsine. (section B, 3.2). L'anticorps utilisé (cl.36) est dilué 1 :1000 dans du PBS-BSA 2% et provient de Novacastra Lab. (Newcastle, UK) (Toribara et al., 1993). L'anticorps secondaire est un anti-lapin FITC utilisé à une dilution 1 :50 (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada).

5) Coloration au PAS (Periodic acid Schiff)

Les études sont effectuées sur une monocouche de cellules NCI-N87 ou de cellules HGE.20. Pour ce faire, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre stériles et sont cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent le stade de confluence voulu. Les spécimens sont fixés dans une solution de formaldéhyde 3,7% diluée dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7.4 et ce, pour 15 minutes à température pièce. Les

lamelles sont ensuite lavées 2 fois 5 min. au PBS 1X. Suit une incubation de 10 minutes dans l'acide périodique 1% dans l'eau bidistillée. On lave ensuite les lamelles pendant 5 minutes à l'eau courante puis on incube pendant 15 minutes avec le réactif de Schiff (Fisher SS32-500). On lave les lamelles une dernière fois à l'eau courante avant de les faire sécher et de les monter sur des lames. On visualise les résultats en contraste de phase à l'aide d'un microscope inversé IDO3 (Zeiss Canada).

6) Dosages

6.1) Préparation des échantillons

Les cellules NCI-N87 ou HGE.20 sont cultivées dans des boîtes-pétris T-25 (Falcon, Beckton-Dickinson, Labware, Franklin Lakes, NJ). Une fois atteint le degré de confluence désiré, les cellules sont tout d'abord trypsinisées puis centrifugées. Le culot est resuspendu dans 250 μ l de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco BRL Life technologies, Burlington, Ontario, Canada) avant d'être conservé à -80°C jusqu'au moment d'utilisation. Notez que le milieu de culture est également conservé à cette température puisqu'il est utilisé afin de vérifier la capacité de sécrétion des cellules. Le moment venu, les cellules et le milieu sont décongelés puis les cellules sont homogénéisées par sonification environ 5 sec avant d'être utilisées pour les dosages.

6.2) Dosage des protéines

La quantité de protéines de chacun des échantillons est évaluée d'après la méthode de Lowry et al. (1951) en utilisant un échantillon standard d'albumine sérique. Cette courbe standard permet de calculer le contenu protéique des échantillons lesquels sont lus par spectrométrie à une longueur d'onde de 750 nm. Le contenu protéique est exprimé par mg de cellules.

6.3) Dosage lipase

L'activité lipolytique attribuée à la lipase gastrique humaine (HGL) est mesurée dans les cellules lysées ainsi que dans les milieux correspondant en utilisant comme substrat un triglycéride à longue chaîne : le glycérol- C^{14} trioléate (Amersham Canada, Oakville, Ontario, Canada). Le substrat est préparé tout juste avant son utilisation. Celui-ci est constitué des éléments suivants (pour 1 ml de substrat): 1.2 μ moles de glycérol- C^{14} trioléate (stock : 250 μ Ci par 2,5 ml), 8,47 μ moles de trioléine (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), 10 μ moles de tampon citrate-phosphate pH 6.0, 0.1 μ mole de BSA (albumine sérique bovine sans acide gras, Sigma) qui servira de transporteur aux acides gras libérés puis 2 μ moles de Triton X-100 (Sigma). Le trioléate radioactif est déposé dans un tube de verre et maintenu sur la glace pendant la préparation. Après évaporation de l'éluant heptane sous un jet d'azote, la trioléine, qui est très

visqueuse, est ajoutée au poids. La valeur de la pesée est soigneusement notée car elle est utilisée lors des calculs de l'activité enzymatique. Ensuite, tous les composants manquants sont incorporés au mélange puis la préparation est vortexée quelques minutes et soniquées jusqu'à l'obtention d'une émulsion laiteuse (3 fois 15 secondes). L'essai enzymatique est réalisé en ajoutant 100 μ l de substrat à 150 μ l d'homogénat cellulaire et/ou de milieu de culture. Ce mélange réactionnel est par la suite incubé pendant 60 minutes à une température de 37°C et ce, sous agitation dans un bain Dundorf. La réaction est arrêtée en ajoutant 3,25 ml d'une solution de méthanol : chloroforme : heptane (1,41 : 1,25 : 1) d'après la méthode de Belfrage et Vaughan (1969). Les acides gras libérés sont par la suite extraits en utilisant 1,05 ml d'une solution de carbonate-borate pH 10 et en centrifugeant 20 min à 3000 RPM. Suite à cette centrifugation, les acides gras se retrouvent dans la phase supérieure. On recueille donc 1 ml de cette phase à laquelle on ajoute 10 ml de liquide à scintillation (ReadyGel, Beckman Instruments Inc, Mississauga, Ontario, Canada). La radioactivité des échantillons est mesurée pendant 5 min à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman Instruments Inc., Mississauga, Ontario, Canada). L'activité spécifique est exprimée en nmoles d'acides gras libres/min/mg de protéines.

6.4) Dosage pepsine

L'activité pepsine des homogénats et de leur milieu de culture est déterminée en utilisant une version modifiée de la méthode de Anson et Mirsky (1932). Brièvement, 100 μ l d'échantillon sont tout d'abord soumis à une préincubation de 18 min à température pièce dans 900 μ l de tampon glycine-HCl pH 2.0. Cette première incubation est suivie d'une deuxième de 2 min à 37°C. Cette préincubation est réalisée dans le but de cliver le pepsinogène en pepsine ce qui du même coup permet son activation. Par la suite, 1 ml d'une solution d'hémoglobine bovine 2%, ayant été préalablement dialysée contre un gradient de HCl 0.1N, est ajouté et sert de substrat à la réaction. La réaction est arrêtée après 10 minutes à l'aide de 2 ml d'acide trichloroacétique 6,2%. Les tubes sont ensuite gardés sur la glace pour un minimum d'une heure avant d'être centrifugés 20 min à 3000 RPM ce qui permet de séparer les acides aminés libérés lors de la réaction. Ceux-ci se retrouvent en effet dans le surnageant, ce qui permet de les quantifier par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 280 nm. Une courbe standard de L-tyrosine est utilisée en parallèle afin de permettre la quantification. L'activité spécifique est exprimée en unités internationales, soit en μ moles/min/mg de protéines.

7) Modulation de la synthèse/sécrétion

7.1) Facteurs de croissance et hormones

Afin d'évaluer les effets potentiels des facteurs de croissance et des hormones sur la synthèse/sécrétion des zymogènes gastriques dans la lignée cellulaire NCI-N87 et la lignée HGE.20, ils sont ajoutés à différents temps de culture (à confluence ou 6 jours post-confluence) pour une durée de 48 heures. Les cellules et les milieux de culture sont ensuite récoltés puis conservés à -80°C pour d'éventuels dosages (protéines, lipase, pepsine) tels que décrits précédemment (section B, 6).

Les facteurs de croissance et les hormones furent testés dans les études sur la modulation de la synthèse/sécrétion aux concentrations optimales suivantes, déterminées précédemment dans des cultures primaires d'épithélium gastrique (Fukamachi et al, 1994; Kato et al, 1999; Matsubara et al, 1996; Rokutan et al, 1998; Rutten et al, 1991 et Takahashi et al, 1995): KGF (50 ng/ml, Peprotech Inc; Cederlane Laboratories Limited, Hornby, Ontario, Canada), EGF (100 ng/ml, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA), TGF β 1 (1 ng/ml, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN), insuline (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma, St-Louis, MO) et hydrocortisone (1 $\mu\text{g/ml}$, Calbiochem-Novabiochem Corporation, LaJolla, CA).

7.2) Co-culture NCI-N87/HGE.34

Afin de vérifier si la présence de fibroblastes nourriciers peut moduler la synthèse et la sécrétion de la lipase gastrique humaine et du pepsinogène-5 dans les cellules NCI-N87, les cellules sontensemencées sur une culture confluyente de fibroblastes gastriques fœtaux HGM.34 avec ou sans facteurs de croissance ou hormones. Les cellules sont ainsi incubées pour une durée de 36 heures avant d'être récoltées avec leur milieu de culture. Les échantillons sont gardés à -80°C pour éventuellement être dosés afin de connaître leur activité lipase et pepsine (section B, 6).

7.3) Clonage des NCI-N87

Afin d'homogénéiser le phénotype de la lignée NCI-N87 et de la stabiliser, nous avons cloné la lignée NCI-N87. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de dilution-limite. Ainsi, une sous-population de cellules NCI-N87 est trypsinisée, via l'utilisation d'anneaux de clonage, puisensemencée dans un pétri de 100 mm. Cette étape est répétée un certain nombre de fois soit, jusqu'à ce que la culture exhibe un phénotype polyhédrique homogène. Nous avons ainsi généré la nouvelle lignée HGE.20.

7.4) Culture des HGE.20 sur une matrice de laminine-1

Afin d'ensemencer les cellules HGE.20 sur une matrice de laminine-1 (human laminin, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) on laisse tout d'abord adhérer la laminine-1 (10 ug par ml de milieu sans sérum : déposition de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) au pétri pendant 1 heure à 37°C. On enlève ensuite le milieu en surplus puis on ensemence nos cellules comme à l'habitude.

8) Immunobuvardage de type Western blot

Pour l'électrophorèse, les cellules sont dissociées puis solubilisées dans un tampon de lyse (125 mmol/L Tris-HCl, 4% SDS, 2% β -mercaptoéthanol, 20% glycérol et 0,08% bleu de bromophénol). Elles sont ainsi conservées à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation.

8.1) Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Des aliquots de protéines (60-80 μg) sont séparés par électrophorèse en conditions réductrices et dénaturantes (Thomas et Kornberg, 1975) sur un gel séparateur dont la concentration d'acrylamide est de 12% et de pH 8.8 (ratio acrylamide/bis : 30 :0.15). Le gel d'entassement est composé d'acrylamide à 4% pH 6.8 et le ratio acrylamide/bis est ici de 30 :0.08.

Les aliquots sont tout d'abord dénaturés pendant 10 min à 100°C avant d'être déposés dans leur puits respectif. La migration est effectuée 90 min à 70 Volts puis 3-5 hres à 170 Volts à température pièce. La migration est effectuée dans une chambre d'électrophorèse (Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, model V16; Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Le tampon d'électrophorèse est constitué de 1% SDS, 25 mM Tris et de 0,192 M glycine. Les marqueurs « *Rainbow full range, RPN 800* » (Amersham Life science, Oakville, Ontario, Canada) et « *Benchmark protein ladder* » (Gibco BRL Life technologies, Burlington, Ontario, Canada) ont été utilisés à titre d'indicateurs de poids moléculaires.

8.2) Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Une fois la séparation des protéines sur gel de polyacrylamide effectuée par électrophorèse terminée, les protéines sont électro-transférées pendant 90 min à 100 Volts à 4°C sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Le tampon de transfert contient 25 mM Tris, 0.192 M glycine et 20 % méthanol (Towbin et al, 1979). Une fois le transfert effectué, la membrane est lavée 2 fois 5 min dans l'eau puis elle est bloquée pendant 14-16 hres à 4°C à l'aide d'une solution de PBS et de lait en poudre 6% (Carnation, Nestlé, Don Mills, Ontario, Canada).

8.3) Détection par chemiluminescence

8.3.1) Détection de la lipase gastrique humaine

Une fois le blocage terminé, les membranes sont incubées 75 min avec l'anticorps primaire à une concentration 1 : 1000 dans une solution PBS-lait en poudre 3% puis elles sont lavées 6 fois 10 min à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,3% de Tween-20. À la suite de ces lavages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (anti-lapin, 1 : 5000, Tropix, Bedford, MA) pour une période de 30 min. Suivent 6 lavages de 10 min chacun. L'incubation suivant ces lavages en est une de 20 min dans une solution de streptavidine qui elle est conjuguée à la phosphatase alcaline (1 :10 000, Tropix, Bedford, MA) et celle-ci est suivie de 30 min de lavage. Finalement, les membranes sont incubées 2 fois 2 min dans le tampon réactionnel (assay buffer de Tropix) avant d'être incubées 5 min avec le substrat (CSPD, Western-Light Plus, Tropix) pour finalement être exposées sur un film X-OMAT de Kodak.

8.3.2) Détection des récepteurs de l'EGF et du TGF β (TGF β -RII)

Une fois le blocage terminé, les membranes sont incubées 75 min avec l'anticorps primaire correspondant à une concentration 1:1000 dans une solution PBS-lait en poudre 3% puis elles sont lavées 6 fois 10 min à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,3% de Tween-20. À la suite de

ces lavages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (anti-mouse, 1 : 5000, Tropix, Bedford, MA) pour une période de 30 min. Suivent 6 lavages de 10 min chacun. L'incubation suivant ces lavages en est une de 20 min dans une solution de streptavidine qui elle est conjuguée à la phosphatase alcaline (1 :10 000, Tropix, Bedford, MA) et celle-ci est suivie de 30 min de lavage. Finalement, les membranes sont incubées 2 fois 2 min dans le tampon réactionnel (assay buffer de Tropix) avant d'être incubées 5 min avec le substrat (CSPD, Western-Light Plus, Tropix) pour finalement être exposées sur un film X-OMAT de Kodak.

III. RÉSULTATS

A) Immunolocalisation de la laminine-5 et des sous-unités des intégrines dans l'estomac fœtal humain en développement.

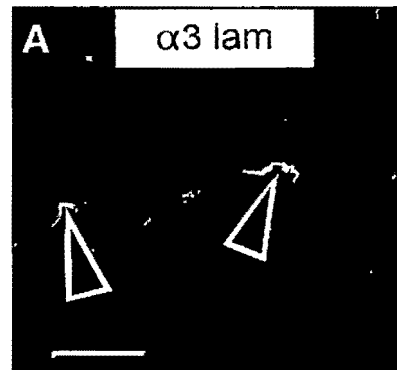
1. Localisation de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5.

L'expression de la laminine-5 dans la muqueuse de l'estomac fœtal a été étudiée au moyen de l'immunofluorescence indirecte dans le corps et l'antrum pylorique d'estomac fœtal de 12 et 20 semaines de gestation (figure 4). Pour ce faire, on a utilisé l'anticorps contre la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5. Cet anticorps reconnaît également les laminine-6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$) et laminine-7 ($\alpha 3\beta 2\gamma 1$) car toutes les deux sont également composées de la chaîne $\alpha 3$. Ces deux laminines, ainsi que la laminine-5, forment un complexe moléculaire très bien assemblé ce qui ne met donc pas en doute la localisation tissulaire de la laminine-5. L'anticorps contre la chaîne $\alpha 3$ des laminines est majoritairement associé avec l'épithélium de surface. Dans la région du corps d'un spécimen de 12 semaines, l'immunoréactivité de l'anticorps est observée à la membrane basilaire des cellules de surface différenciées et indifférenciées. On peut également observer que la base des glandes en formation est dépourvue de marquage (figure 4A). À un stade de développement plus avancé (20 semaines), la chaîne $\alpha 3$ est associée avec l'épithélium de surface ainsi qu'avec l'épithélium du fovéolus. À cet âge, la portion glandulaire des glandes

Figure 4 : Expression et distribution de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5 dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antra pylorique d'estomac foetal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5. On peut voir que la chaîne $\alpha 3$ de la laminine est présente à tous les stades de développement au niveau de la membrane basilaire de l'épithélium mucigène différencié (têtes de flèche en A et B). Noter l'absence de réactivité à la base des glandes de type fundique (A et B) ainsi que le marquage plus étendu au niveau des glandes de l'antra pylorique (C). On a donc un marquage décroissant de la surface vers la base de la glande. Le marquage apical représente un marquage non-spécifique des cellules à mucus qui n'a pu être bloqué. Les barres représentent 100 μm .

Figure 4. Expression et distribution de la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5 dans la muqueuse gastrique en développement



Corps de 12 semaines



Corps de 20 semaines



Antre pylorique de 20 semaines

de type fundique est négative et on peut remarquer un marquage non-spécifique de l'anticorps primaire avec les granules des cellules à mucus de surface (figure 4B). Finalement, un marquage similaire est observé au niveau de l'antrum pylorique. Dans cette région, c'est seulement la portion distale de l'unité sécrétrice qui est négative pour la chaîne $\alpha 3$ de la laminine-5 (figure 4C).

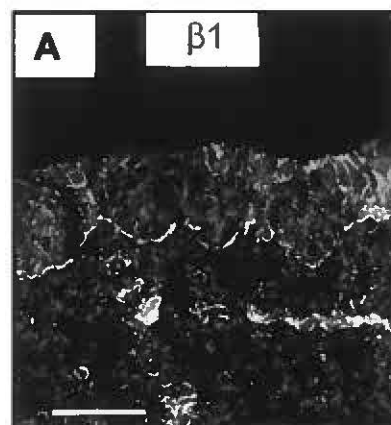
2. Localisation de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines.

La localisation de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines a été effectuée au moyen de la technique d'immunofluorescence indirecte. Cette sous-unité est reconnue comme pouvant s'associer à plusieurs sous-unités α . Dans la glande gastrique en formation, la sous-unité $\beta 1$ est présente à tous les stades du développement et ce, dans chacune des régions de l'estomac fœtal (figure 5). Bien que la sous-unité $\beta 1$ soit en majorité concentrée à la base des cellules épithéliales, on remarque également un marquage au niveau de leur cytoplasme ainsi qu'aux zones de contacts intercellulaires. De plus, on observe un marquage de divers composants de la lamina propria, soit des cellules musculaires, des vaisseaux sanguins ainsi que du mésenchyme subépithélial.

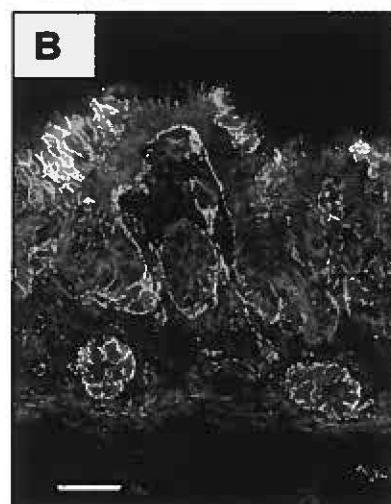
Figure 5 : Expression et distribution de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antra pylorique d'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\beta 1$ des intégrines. On peut voir que la sous-unité $\beta 1$ des intégrines est présente dans tout l'épithélium ainsi que dans le mésenchyme. Bien qu'il y ait présence de la sous-unité $\beta 1$ à la périphérie des cellules et dans le cytoplasme, le marquage est principalement concentré à la base des cellules épithéliales et ce, à tous les stades de développement. Les barres représentent 100 μm .

Figure 5. Expression et distribution de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement



Corps de 12 semaines



Corps de 20 semaines



Antre pylorique de 20 semaines

3. Localisation de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines.

La sous-unité $\beta 4$ des intégrines a été localisée dans l'estomac fœtal à l'aide de l'immunofluorescence indirecte (figure 6). Cette sous-unité est présente dans la membrane basilaire d'un spécimen âgé de 12 semaines selon un patron d'expression discontinu (figure 6A). Ainsi, contrairement à la sous-unité $\beta 1$ qui est retrouvée avec une même intensité dans la totalité de la membrane basilaire, la sous-unité $\beta 4$ démontre un gradient d'expression décroissant vers la base des glandes en formation. Dans la muqueuse gastrique de type fundique, la sous-unité $\beta 4$ est concentrée au niveau de la surface de la glande et du fovéolus. Elle est également détectée dans la portion médiane ainsi qu'à la base des glandes mais selon un gradient décroissant d'expression (figure 6B). Une distribution similaire est observée dans la région de l'antrum pylorique tel que démontré à la figure 6C.

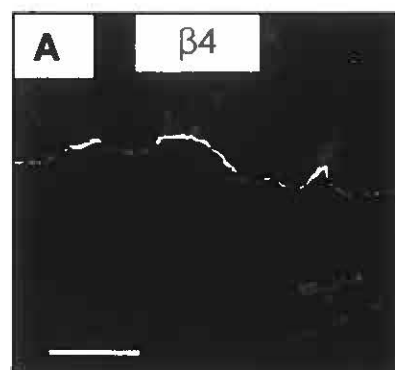
4. Localisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines.

La technique de l'immunofluorescence indirecte a permis de localiser la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines dans l'estomac fœtal humain. La sous-unité $\alpha 2$ possède une distribution générale qui est ubiquitaire et ce, à tous les stades de développement ainsi que dans chacune des régions de l'estomac. Cependant, sa distribution cellulaire varie énormément selon les populations épithéliales (figure 7). Ainsi, au niveau de l'épithélium de surface et de

Figure 6 : Expression et distribution de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antrum pylorique d'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal de rat dirigé contre la sous-unité $\beta 4$ des intégrines. On peut voir que cette sous-unité est localisée à la base de toutes les cellules épithéliales. On dénote également un gradient décroissant dans l'intensité du marquage allant de la surface vers la base de la glande. Les barres représentent 100 μm .

Figure 6. Expression et distribution de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement



Corps de 12 semaines



Corps de 20 semaines

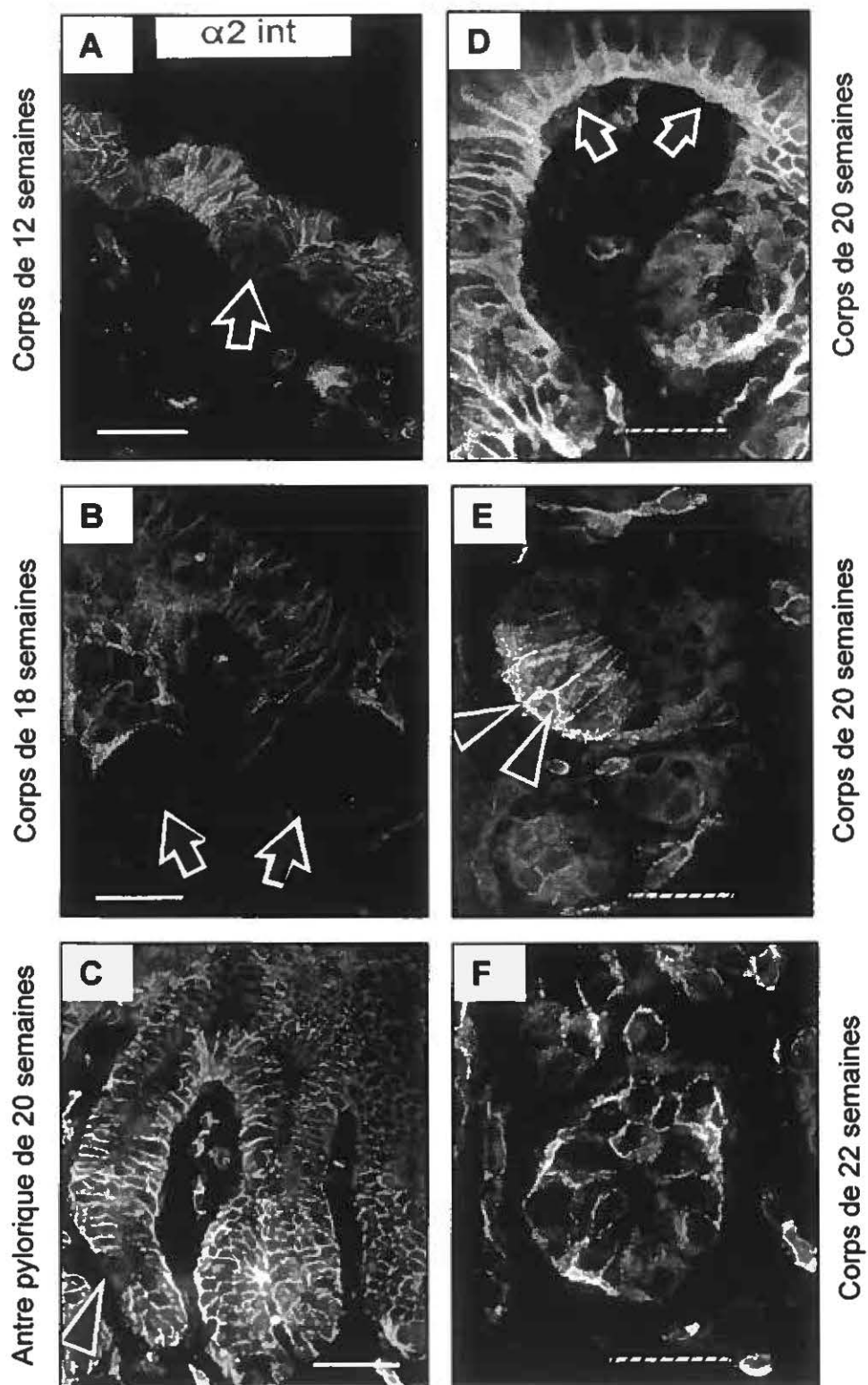


Antre pylorique de 20 semaines

Figure 7 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antré pylorique d'estomac foetal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines. La sous-unité $\alpha 2$ des intégrines est présente aux sites de jonctions intercellulaires des cellules localisées à la surface et dans la partie supérieure des glandes en formation (A et B) alors que les cellules différenciées à la base des unités de type fundique sont négatives (flèches en A et B). Une localisation de la sous-unité $\alpha 2$ au niveau du domaine basal des cellules est évidente dans l'épithélium de surface vers l'âge de 20 semaines (flèche en D). Une translocation basale de cette sous-unité est également établie de manière progressive dans l'épithélium glandulaire à 20 et 22 semaines de gestation (têtes de flèche en E et F respectivement). Dans la région de l'antré pylorique (C), on peut voir que cette sous-unité est très abondante et qu'elle est déposée au pôle basal des cellules (la tête de flèche indique deux cellules négatives pour la sous-unité $\alpha 2$). Les barres pleines représentent 100 μm alors que les barres hachurées représentent 50 μm .

Figure 7. Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement



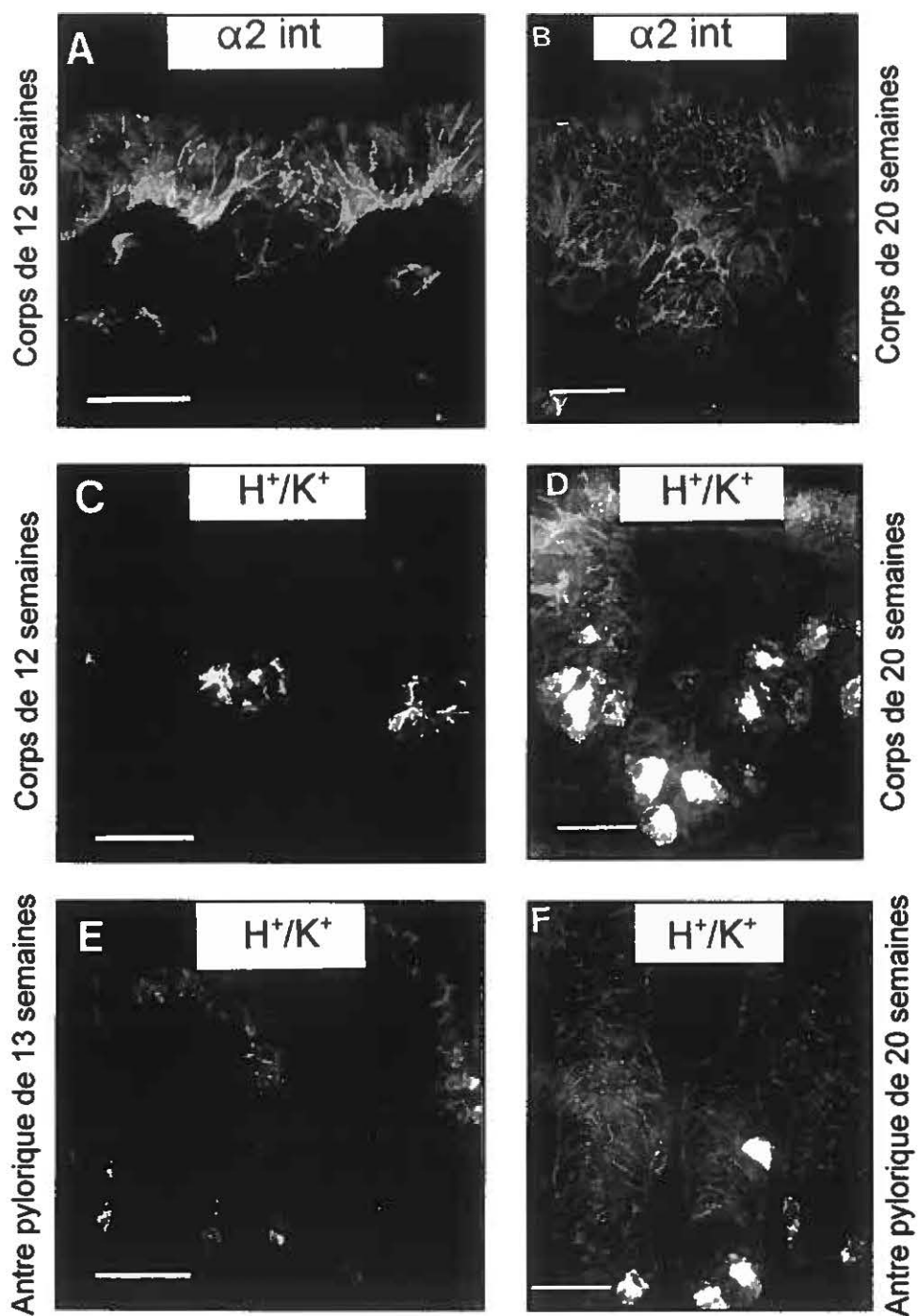
l'épithélium fovéolaire des glandes de type fundique, un marquage positif est observé aux sites de contacts cellule-cellule durant les étapes initiales de la morphogénèse glandulaire (figures 7A et 7B). À un stade plus avancé, on peut également remarquer une localisation importante de la sous-unité $\alpha 2$ au niveau du domaine basal des cellules de surface (figure 7D). La situation sera similaire au niveau des glandes de l'antra pylorique qui sont plus allongées (figure 7C). Si on regarde plus attentivement la localisation de la sous-unité $\alpha 2$ dans les unités de type fundique, on observe un marquage intercellulaire intense dans l'épithélium de la portion glandulaire (figure 7B). De plus, dans cette région, on remarque une redistribution de la sous-unité $\alpha 2$ au niveau du pôle basal des cellules. Cette re-localisation s'effectue vers l'âge de 20-22 semaines de gestation (figures 7E et 7F).

L'expression de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines est absente dans une sous-population de cellules différenciées retrouvées à la base des glandes en formation (figure 7A) ainsi que dans une glande de type fundique plus mature (figure 7B). Ce phénomène est également observé, à un moindre niveau, dans une glande de type antral (figure 7C). En comparant le marquage obtenu avec l'anticorps contre la sous-unité $\alpha 2$ et le marquage obtenu avec un anticorps contre la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$, ceci a permis de suggérer que les cellules négatives pour $\alpha 2$ seraient des cellules pariétales et ce, à chacun des âges et dans chacune des régions de l'estomac étudiées (figure 8A comparée avec 8C (corps de 12 sem.), figure 8B comparée avec 8D (corps de 20 sem.) et figure 8E,F comparée avec 7C (antra pylorique).

Figure 8 : Distribution comparative de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antra pylorique d'estomac foetal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines ou la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$. Au niveau du corps et du fundus, la disparition précoce de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines coïncide avec l'apparition de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans les cellules pariétales différenciées à la base des glandes (A et C). Au cours du développement, le marquage pour la pompe $H^+K^+ATPase$ s'intensifie dans les cellules négatives pour la sous-unité $\alpha 2$ (B et D). Au niveau de l'antra pylorique, seulement quelques cellules pariétales positives pour la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ sont observées (E et F). Les barres représentent 100 μm .

Figure 8. Distribution comparative de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la muqueuse gastrique en développement



Afin de confirmer cette hypothèse, l'immunofluorescence indirecte des deux sous-unités a été effectuée sur deux coupes sériées d'un fœtus de 19 semaines puisque la stratégie de double immunofluorescence a été mise de côté car les deux anticorps sont des monoclonaux de souris (figure 9). Suite à cette expérience, on a pu confirmer que les cellules négatives pour la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines étaient bel et bien positives pour la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ (figures 9A et 9B) démontrant ainsi que l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ et la différenciation des cellules pariétales de l'estomac sont deux phénomènes mutuellement exclusifs.

5. Localisation de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines.

La sous-unité $\alpha 3$ des intégrines a été localisée à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte sur des coupes d'estomac fœtal (figure 10). Tout comme on l'a remarqué pour la chaîne $\alpha 3$ des laminines dans les glandes de type fundique, la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines démontre un marquage plus intense au niveau des cellules épithéliales de surface et ce, autant à 12 semaines (figure 10A) qu'à 20 semaines de gestation (figure 10B). La réaction positive de l'anticorps est observée au niveau du domaine latéral des cellules. On remarque également un marquage, qui est cependant moins intense, à la périphérie des cellules glandulaires. Cependant, le marquage le plus frappant se situe au niveau du pôle basal des cellules de surface et des cellules foveolaires où on remarque une localisation évidente de la sous-unité $\alpha 3$. Il semble donc y avoir une co-localisation de la sous-unité $\alpha 3$ des

Figure 9 : Co-localisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antrum pylorique d'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines ou dirigé contre la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$. La localisation est effectuée sur deux coupes sériées. L'absence de la sous-unité $\alpha 2$ dans les cellules glandulaires données (trois groupes de cellules négatives sont identifiées à l'aide des têtes de flèches) corrèle avec un marquage positif pour la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$. Une expérience-contrôle a été effectuée en omettant l'incubation avec l'anticorps primaire (C; p signifie cellules pariétales). Les barres représentent 100 μm .

**Figure 9. Co-localisation de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines
et de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ dans la
muqueuse gastrique foetal**

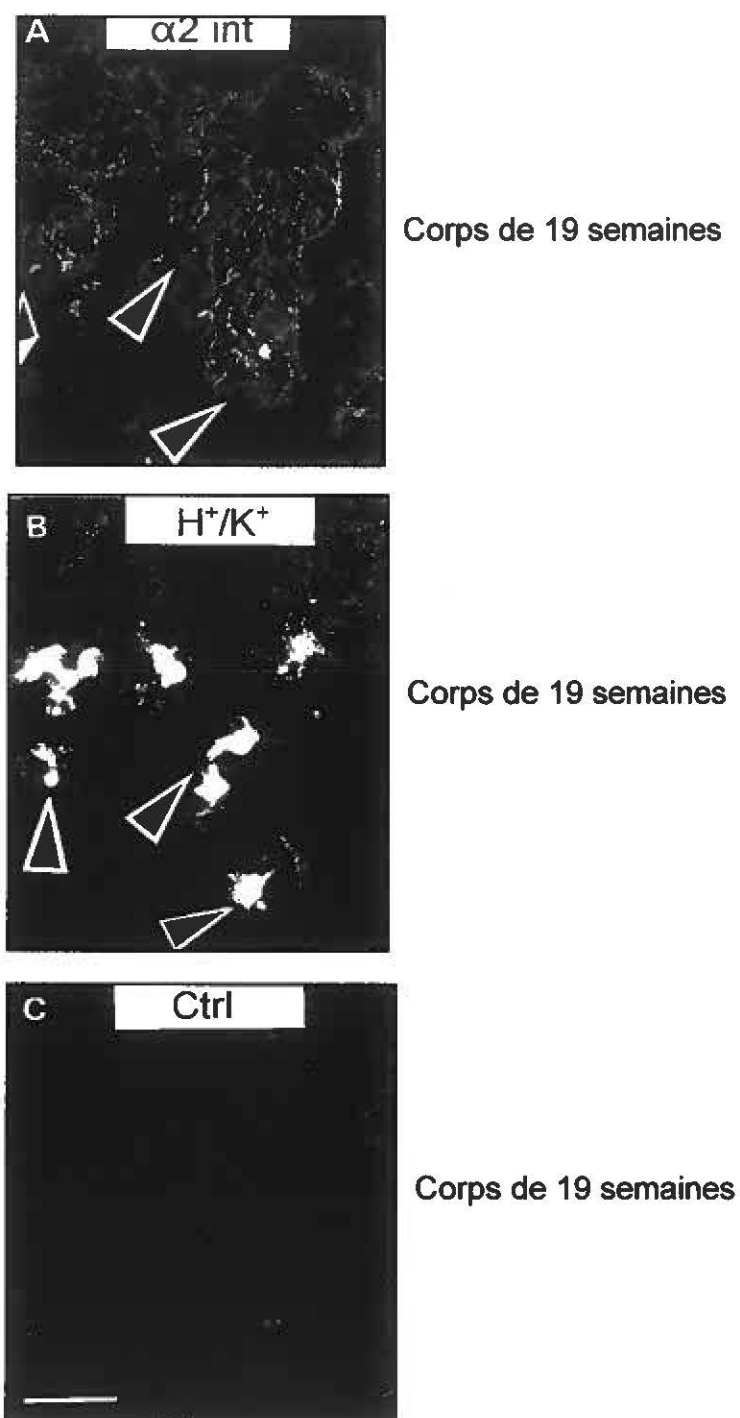
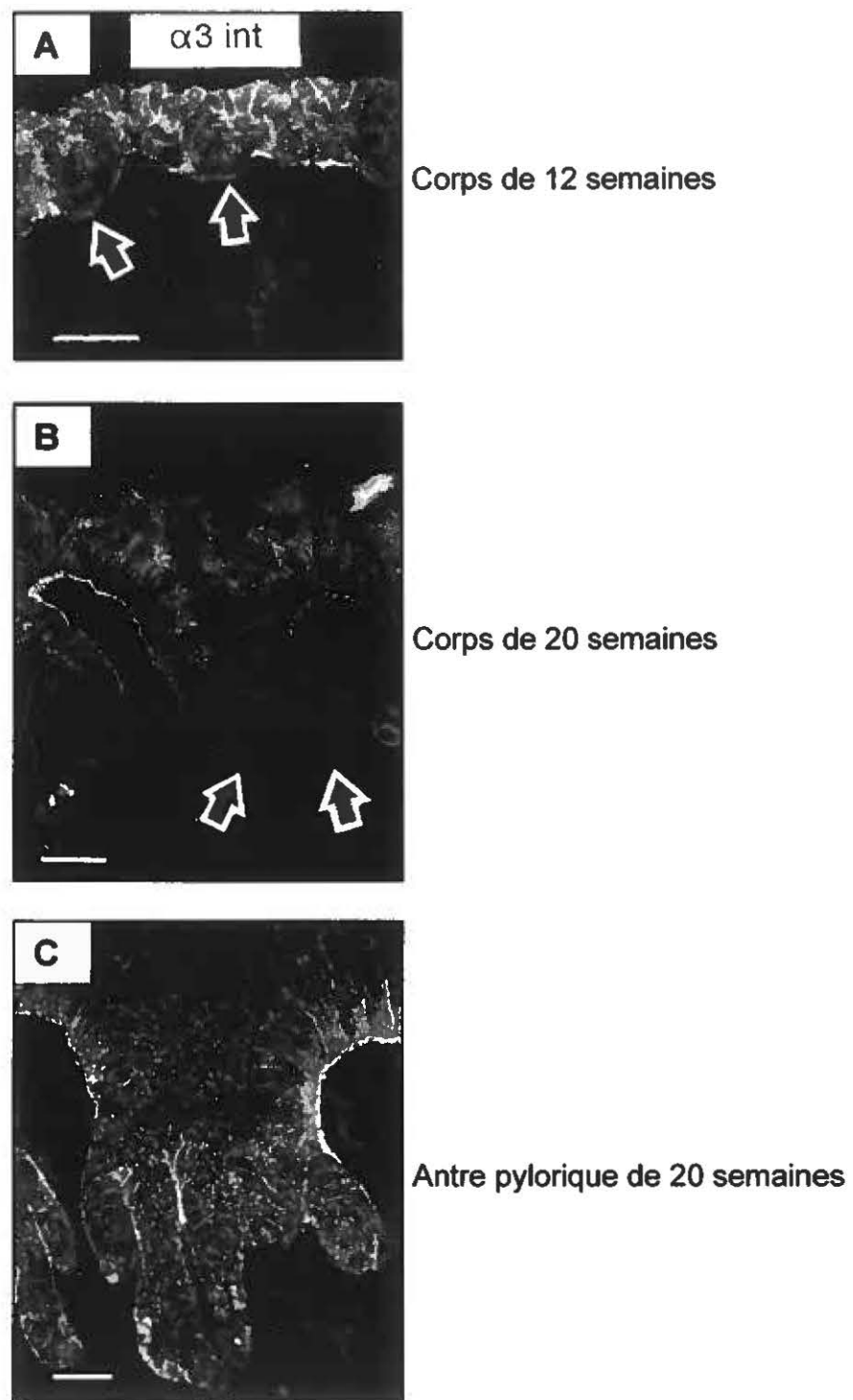


Figure 10 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antrum pylorique d'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines. On peut remarquer une réaction positive ubiquitaire aux zones de contacts cellule-cellule. On peut également voir que cette sous-unité est abondante au niveau du pôle basal des cellules à mucus. Toutefois, ce marquage semble diminué en intensité à la base des glandes de type fundique (flèches en A et B). Les barres représentent 100 μm .

Figure 10. Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement



intégrines et de la chaîne $\alpha 3$ des laminines dans ces deux compartiments. Finalement, dans la région de l'antré pylorique (figure 10C), un marquage relativement intense encore associé au pôle basal des cellules de surface et aussi aux membranes latérales est observé. Noter que les cellules à mucus de surface démontrent une réaction non-spécifique faible et diffuse à l'anticorps primaire (figure 10B).

6. Localisation de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines.

L'immunofluorescence indirecte de la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines a permis de confirmer sa présence au niveau de l'épithélium du duodénum (contrôle positif; résultat non-montré) et de constater que cette dernière est absente dans l'estomac. Cette affirmation est vraie pour tous les âges étudiés soit : 12 semaines (résultat non représenté) et 18 semaines de gestation (figure 11A) ainsi que pour les deux régions de l'estomac analysées : le corps (figure 11A) et l'antré pylorique (résultat non représenté).

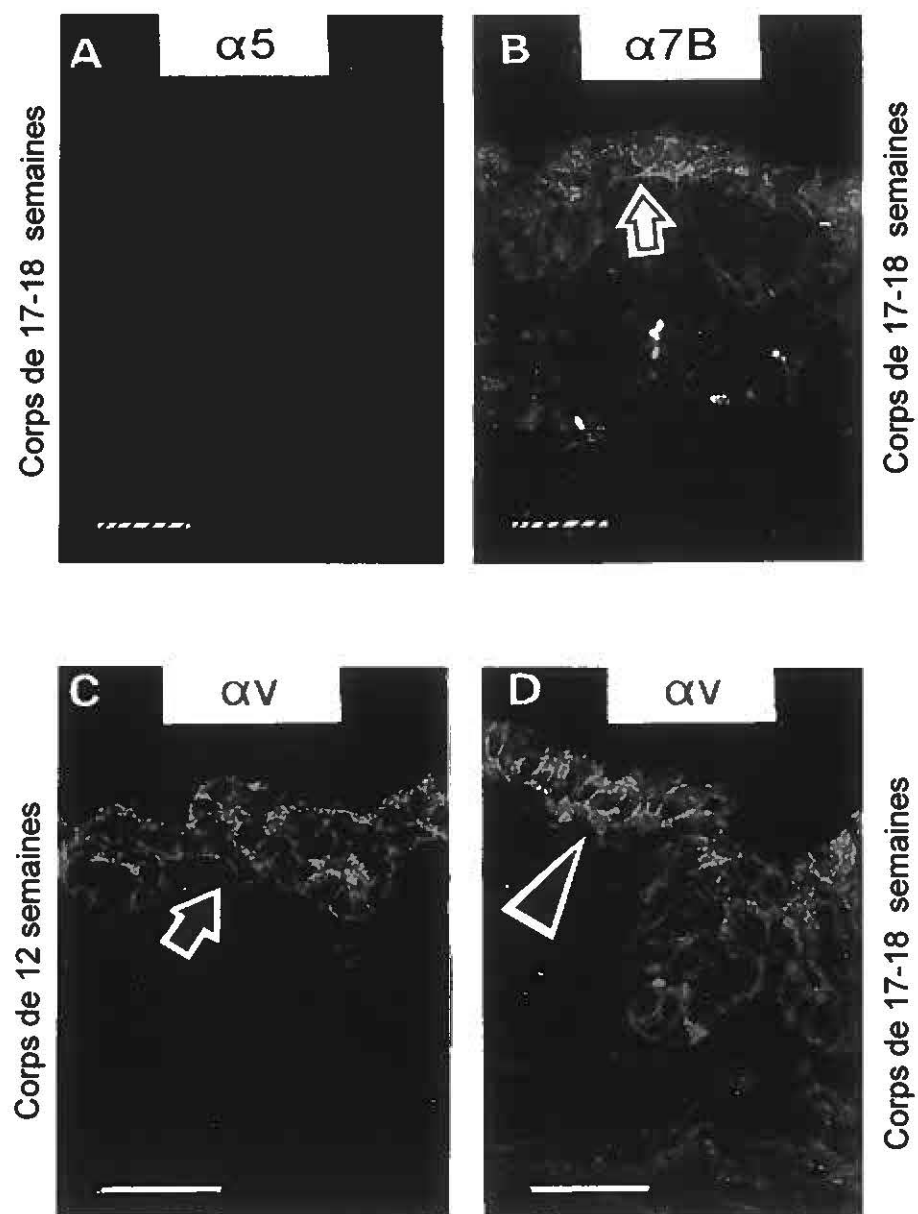
7. Localisation de la sous-unité $\alpha 7A$ et $\alpha 7B$ des intégrines.

C'est à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte que les sous-unités $\alpha 7A$ et $\alpha 7B$ des intégrines ont été localisées dans l'estomac fœtal en développement. Alors que les deux anticorps ont réagi positivement avec les tissus musculaires (résultat non représenté) seul l'anticorps contre la sous-unité $\alpha 7B$ a démontré un marquage positif au niveau de l'épithélium de

Figure 11: Expression et distribution des sous-unités $\alpha 5$ - $\alpha 7B$ et αv des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation de la région du corps de l'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 5$ ou αv , ou avec un anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 7B$ des intégrines. On peut voir sur la photo A que la sous-unité $\alpha 5$ n'est pas présente dans l'estomac fœtal humain. La sous-unité $\alpha 7B$ est très faiblement exprimée dans l'épithélium de surface (B). La sous-unité αv est localisée à la périphérie des cellules épithéliales de surface (tête de flèche en D) tant dans l'épithélium indifférencié (flèche en C) que dans l'épithélium différencié (D). Les barres pleines représentent 100 μm et les barres hachurées représentent 200 μm .

Figure 11. Expression et distribution des sous-unités $\alpha 5$ - $\alpha 7B$ et αv des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement



surface (figure 11B). Cependant, il faut préciser que ce marquage est très faible si on le compare par exemple à la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines. Il faut également préciser qu'il y a présence de marquage non-spécifique de mucus à la surface des glandes.

8. Localisation de la sous-unité αv des intégrines.

Afin de vérifier la localisation de la sous-unité αv des intégrines dans l'estomac foetal, une immunofluorescence indirecte a été réalisée sur des coupes de tissus. Cette technique a permis d'observer que cette sous-unité est associée à l'épithélium stratifié non-différencié (figure 11C) ainsi qu'aux cellules épithéliales de surface d'une glande de type fundique (figure 11D). Un fait important à remarquer avec la sous-unité αv est que le patron de distribution de cette sous-unité diffère des patrons généralement observés pour les sous-unités des intégrines considérées comme des récepteurs des laminines. En effet, en ce qui concerne la sous-unité αv , aucun marquage n'est observé au niveau de l'interface épithélium-membrane basilaire. C'est plutôt un marquage au niveau des zones de contacts intercellulaires qui est observé pour la sous-unité αv dans l'estomac foetal.

9. Localisation de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines.

C'est à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte que la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines a pu être localisée dans l'estomac fœtal en développement. Comme on peut le voir à la figure 12, cette sous-unité est exprimée autant par les cellules épithéliales indifférenciées (figure 12A) que par les cellules épithéliales différenciées (figure 12B). Ainsi, au niveau cellulaire, la sous-unité $\alpha 6$ est clairement déposée dans le domaine basal des cellules et on remarque également un faible marquage cytoplasmique. Finalement, il est important de mentionner qu'aucune différence de marquage n'est observée entre les glandes de type fundique et les glandes de la région de l'antra pylorique (figures 12B et 12C).

B) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

1. Morphologie cellulaire.

Bien que les cellules NCI-N87 exhibent majoritairement un phénotype polygonal, on retrouve plusieurs variants phénotypiques dans la culture (figure 13). Ainsi, certaines cellules sont multinucléées et démontrent un phénotype étalé (figure 13D). Les NCI-N87 forment des colonies denses lorsqu'elles sont ensemencées sur plastique présentant ainsi un patron de croissance en colonie (figure 13A). À confluence, les cellules NCI-N87 forment une monocouche dense et cohérente (figure 13B). Elle peut être maintenue

Figure 12 : Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

Micrographie en immunofluorescence indirecte de coupes en congélation des régions du corps et de l'antrum pylorique d'estomac fœtal humain marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines. La sous-unité $\alpha 6$ des intégrines est exprimée à la base de toutes les cellules épithéliales et elle démontre également un faible marquage cytoplasmique. Les barres représentent 100 μm .

Figure 12. Expression et distribution de la sous-unité $\alpha 6$ des intégrines dans la muqueuse gastrique en développement

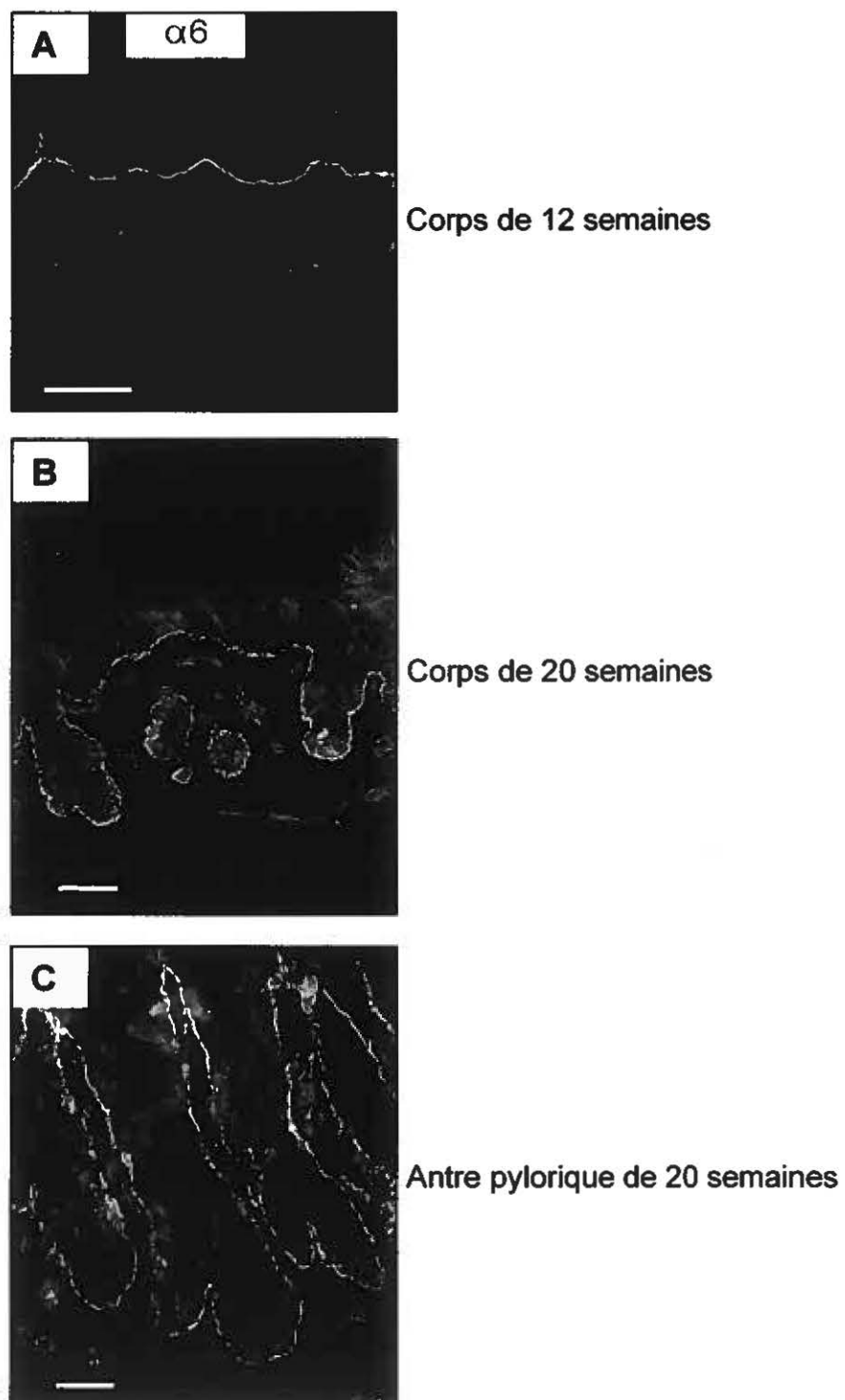
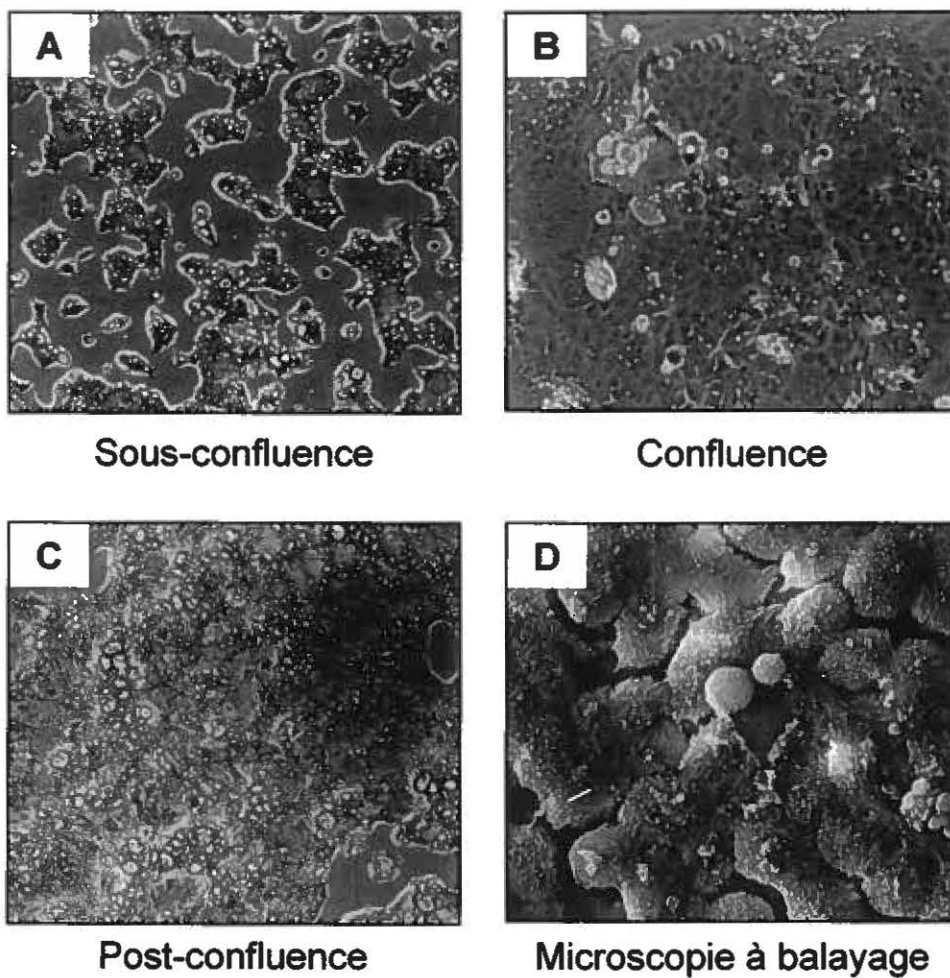


Figure 13: Morphologie cellulaire de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Morphologie cellulaire en contraste de phase (A, B et C) ou en microscopie électronique à balayage de monocouches de cellules NCI-N87 à différents temps de culture. Cultivées sur plastique, les NCI-N87 poussent en colonies compactes (A) et forment une monocouche cohérente lorsqu'elles atteignent la confluence (B). L'intégrité des cellules est maintenue à post-confluence tel que démontré à 20 jours post-confluence (C). Des variations phénotypiques (polygonal, multinucléation, étalement) ainsi que des cellules en décollement sont observées tout au long de la culture. D'autre part, les données de la microscopie électronique à balayage (D) confirment les variations du phénotype, des liens cellule-cellule, et révèlent la présence de nombreuses microvillosités apicales. Le grossissement : A = 16, B-C = 60 et D = 900.

**Figure 13. Morphologie cellulaire de la lignée
gastrique cancéreuse NCI-N87**



jusqu'à 20 jours post-confluence (figure 13C). Il est important de mentionner que, quoique la culture de NCI-N87 puisse être maintenue à post-confluence, la monocouche n'est pas stable. En effet, tout au long de la culture, il y a un détachement spontané d'un certain nombre de cellules et un renouvellement constant de la monocouche de cellules.

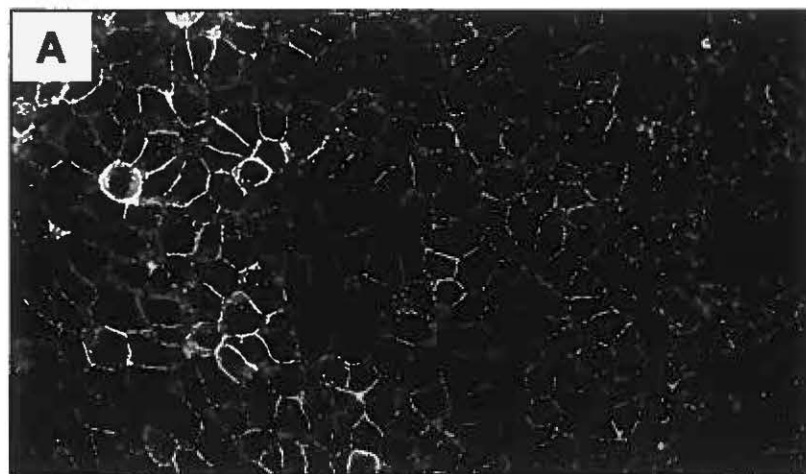
2. Expression des récepteurs de facteurs croissance.

La présence des récepteurs des facteurs de croissance normalement exprimés dans les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique (Basque et al., 1999; Basque et al., 2000) a été vérifiée dans les cellules NCI-N87 (figure 14). Ainsi, à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte, plusieurs récepteurs de type tyrosine kinase ont pu être localisés dans les cellules NCI-N87. Ces récepteurs sont ceux de l'EGF (figure 14A), du KGF (figure 14B), de l'HGF, de l'IGF-1 ainsi que de l'insuline (résultats non représentés). Parmi ceux-ci, c'est le récepteur de l'EGF qui est le plus abondant dans les cellules NCI-N87 (étude par immunobuvardage de type Western). On peut voir sur la figure 14A que le récepteur de l'EGF est ubiquitaire dans la monocouche en culture et qu'il est associé à la membrane des cellules. La présence de ce récepteur dans les NCI-N87 a par la suite été confirmée à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western et on a effectivement identifié une protéine de 175 kD qui correspond à l'EGFR. De son côté, le récepteur du KGF présente un marquage diffus au niveau du cytoplasme des cellules.

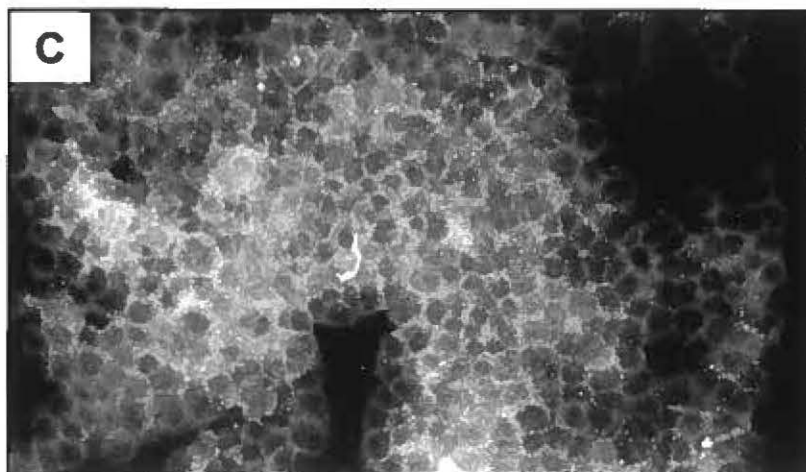
Figure 14 : Expression et distribution des récepteurs de facteurs de croissance dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures confluentes de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'EGF ou un anticorps polyclonal dirigé contre le récepteur du KGF. Les récepteurs pour le facteur de croissance EGF sont très abondants dans les cellules NCI-N87 et ils sont localisés au niveau de la membrane cellulaire (A). L'immunobuvardage de type western confirme la présence de l'EGFR (175 kD) dans la lignée NCI-N87 (B, piste N). Les lignées gastriques cancéreuses AGS (A), Hs746t (H) et Kato-III (K) servent de contrôle positif et la détection de kératine-18 confirme la constance des niveaux de protéines cellulaires. Les récepteurs du KGF présentent un marquage cytoplasmique et on dénote une présence de petits granules cytoplasmiques dans une minorité de cellules (C). Grossissement = 120.

Figure 14. Expression et distribution des récepteurs de facteurs de croissance dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87



Récepteur de l'EGF



Récepteur du KGF

On peut également remarquer la présence de petits granules qui pourraient s'avérer être des vésicules d'endocytose.

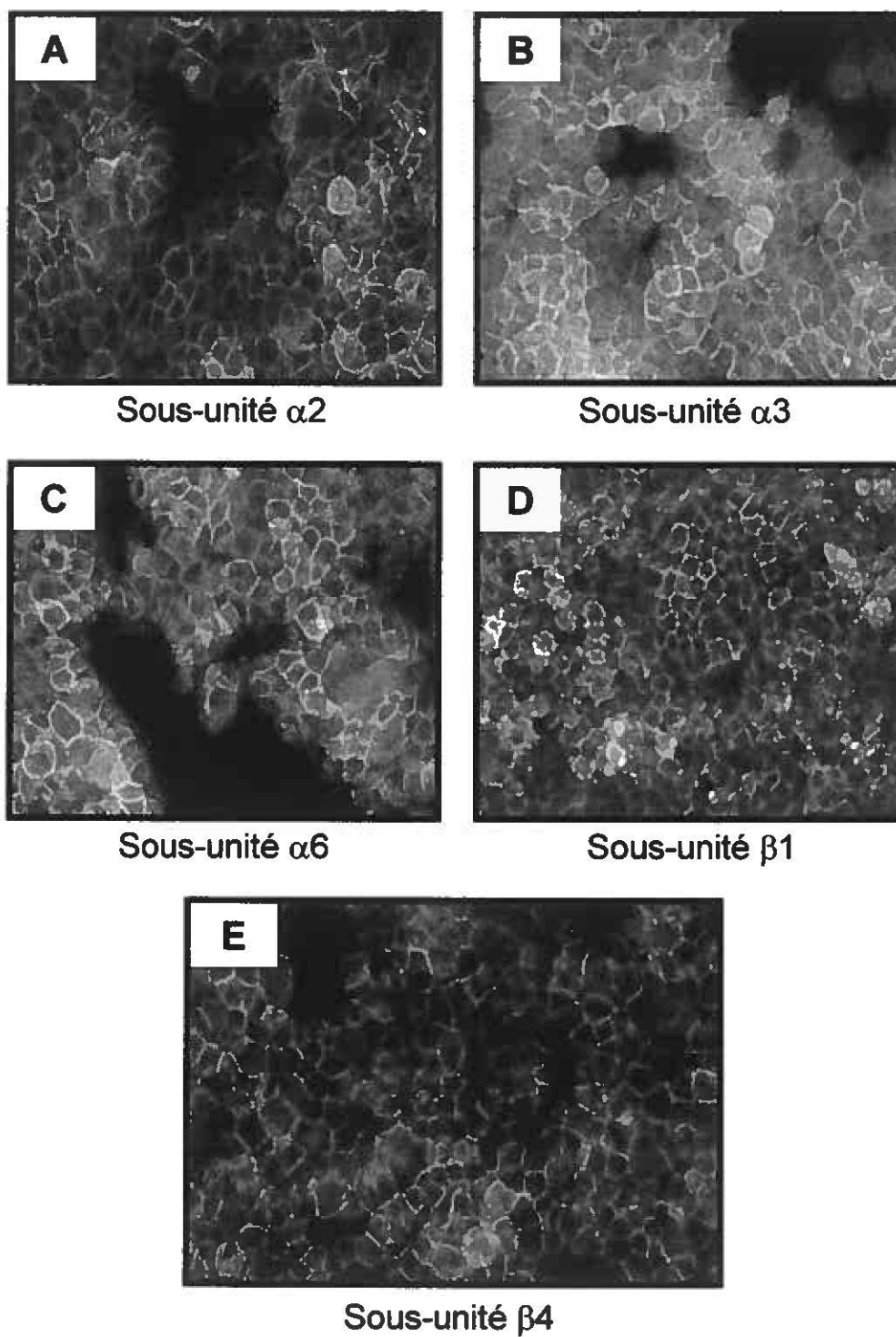
3. Expression des sous-unités de type intégrine.

La présence de diverses sous-unités des intégrines a été vérifiée dans la lignée NCI-N87 en culture. Pour y arriver, nous avons utilisé la technique de l'immunofluorescence indirecte sur des cellules cultivées sur des lamelles de verre. Nous avons constaté la présence des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 4$ (figure 15). Alors que les sous-unités $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 4$ (figures 15A, 15D et 15E respectivement) démontrent un marquage qui est principalement localisé à la périphérie des cellules, les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 6$ des intégrines possèdent, en plus du marquage membranaire, un marquage relativement intense au niveau de leur cytoplasme (figures 15B et 15C respectivement). Ainsi, les sous-unités des intégrines normalement exprimées dans l'estomac foetal humain en développement sont conservées dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87.

Figure 15: Expression et distribution des sous-unités des intégrines dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures confluentes de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'une des sous-unité des intégrines. La sous-unité $\alpha 2$ est présente au niveau des contacts cellule-cellule (A). Un marquage cytoplasmique fort ainsi qu'une localisation au niveau de la membrane des cellules sont observés pour la sous-unité $\alpha 3$ (B). Une localisation de la sous-unité $\alpha 6$ est remarquée à la membrane cellulaire ainsi qu'un faible marquage cytoplasmique (C). Les cellules sont marquées positivement au niveau de leur membrane cellulaire pour les deux sous-unités β soit : $\beta 1$ et $\beta 4$ (D et E). Grossissement = 120.

Figure 15. Expression et distribution des sous-unités des intégrines dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87



4. Expression des marqueurs de polarisation et de différenciation cellulaire.

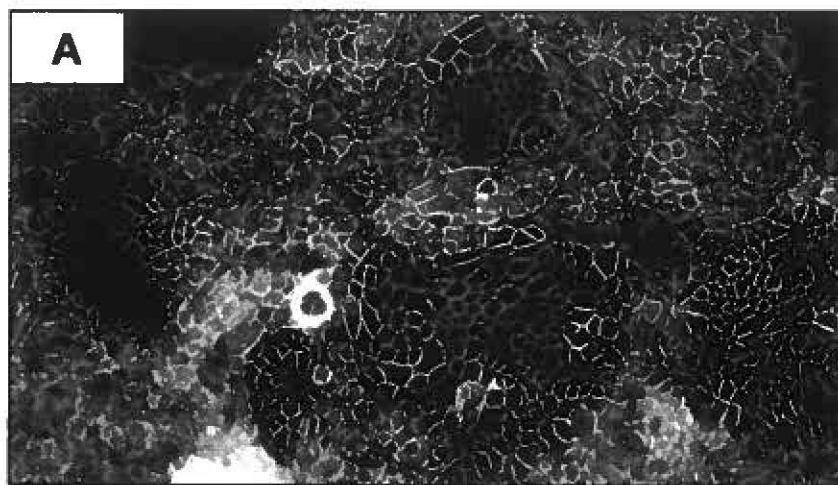
4.1 Marqueurs des jonctions cellulaires

Le statut fonctionnel de la lignée NCI-N87 a été évalué selon diverses approches. Dans un premier temps, nous avons vérifié, à l'aide de l'immunofluorescence indirecte, la présence de certains marqueurs épithéliaux permettant d'évaluer le statut de polarisation des cellules. Ces marqueurs sont la cadhérine-E, qui est un constituant des *zonulae adherens*, et la ZO-1, qui est associée aux *zonulae occludens* (figure 16). Ainsi, nous avons constaté que, suite à l'attachement initial des cellules au plastique, l'ensemble des colonies démontrent un marquage positif à la cadhérine-E au niveau des sites de contacts cellule-cellule (résultat non représenté). De plus, une fois la confluence atteinte, la cadhérine-E est présente à la périphérie des cellules et ce, de manière uniforme à travers toute la monocouche (figure 16A). En plus de la présence de cadhérine-E, les cellules NCI-N87 démontrent une réaction positive pour la protéine ZO-1 qui est un marqueur des jonctions étanches (figure 16B et 16C). Chez une sous-population de ces cellules, la protéine ZO-1 semble très bien assemblée à la périphérie des cellules. Finalement, un fait intéressant à mentionner est que la grosseur des colonies positives pour ZO-1 augmente avec la post-confluence (figure 16C). Il y a donc une augmentation de l'assemblage des *zonula adherens* avec la confluence.

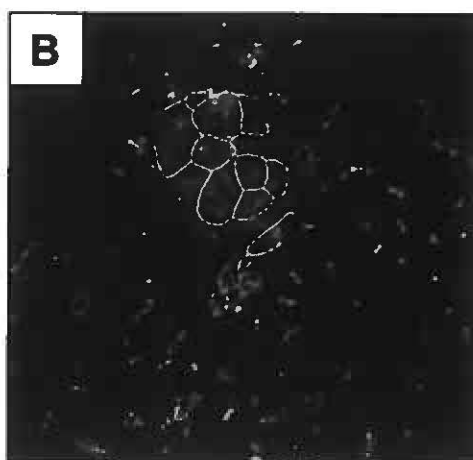
Figure 16 : Expression et distribution des marqueurs de jonctions cellulaires dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures sous-confluentes (B) ou confluentes (A et C) de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la cadhérine-E ou un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ZO-1 qui est un marqueur des jonctions étanches. À confluence, un marquage uniforme est observé pour la cadhérine-E, qui est un marqueur des *zonulae adherens*. Ce marquage se situe aux sites de jonctions cellule-cellule (A). La protéine ZO-1 est détectée dès la sous-confluence des cellules. Elle est observée au niveau des contacts intercellulaires dans de petits amas de cellules (B). La grosseur des amas positifs pour la protéine ZO-1 augmente avec la confluence (C = 10 jours post-confluence). Grossissement = 120.

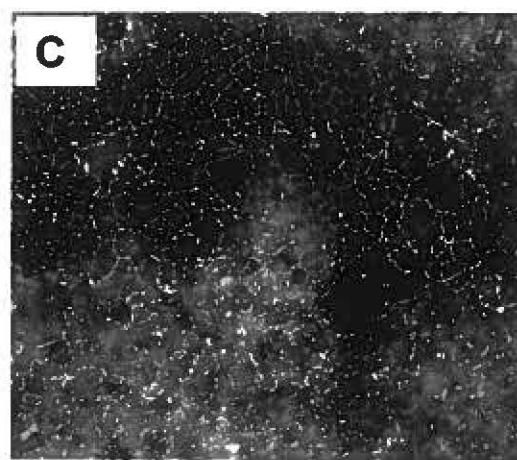
**Figure 16. Expression et distribution des
marqueurs de jonctions cellulaires dans la
lignée gastrique cancéreuse NCI-N87**



Cadhérine-E



ZO-1 à sous-confluence



ZO-1 à post-confluence

4.2 Marqueurs des cellules à mucus.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la technique cytochimique PAS (periodic acid Schiff) afin de vérifier s'il y avait présence de mucus dans la culture de NCI-N87. À l'aide de cette technique, nous avons observé qu'il y avait effectivement présence de mucus dans nos cellules puisque suite à la coloration PAS on observe un marquage à la fois diffus et granulaire dans nos cellules (figure 17A). De plus, nous avons observé que le marquage augmentait lorsque les cellules atteignaient la confluence (figure 17B). Des études subséquentes en immunofluorescence indirecte ont permis de démontrer que la mucine-6, mucine spécifiquement exprimée par les cellules matures du collet, est l'une des glycoprotéines mucigènes exprimées par les cellules NCI-N87 (figure 17C).

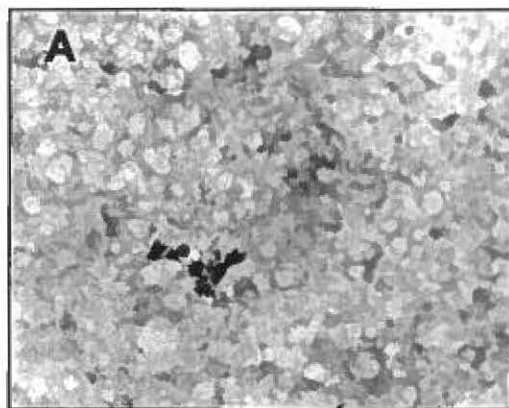
4.3 Marqueurs des cellules pariétales.

Par la suite, nous avons vérifié la présence de la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$, pompe qui est normalement présente dans les cellules pariétales de l'estomac. Suite à l'immunofluorescence indirecte de cette sous-unité, nous avons obtenu un marquage faible et diffus, étendu à la quasi-totalité de la monocouche (figure 17D). Ainsi, il y aurait donc présence d'un marqueur de la fonction acidogénique dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87.

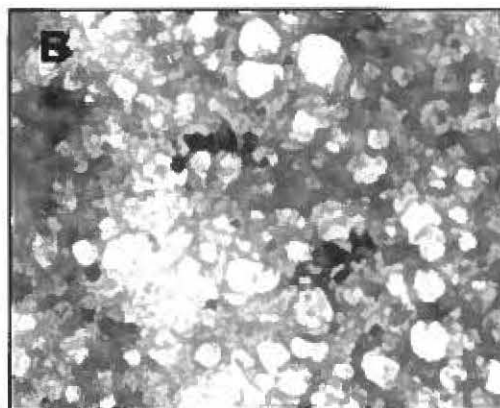
Figure 17 : Expression des marqueurs de différenciation des cellules à mucus et des cellules pariétales dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Micrographie en contraste de phase pour un marquage PAS (periodic acid Schiff) de cultures de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre à sous-confluence (A) ou à confluence (B). Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures confluentes de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps polyclonal dirigé contre la mucine-6 (C) ou un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ des cellules pariétales (D). Un marquage positif du mucus est observé dans les cellules à confluence (A) à l'aide de la technique de PAS. Ce marquage augmente dans les cellules avec la post-confluence (B). La mucine-6 est l'un des produits mucigènes synthétisé puisqu'on observe un marquage positif de cette protéine dans une sous-population de cellules en immunofluorescence indirecte (C). La monocouche de cellules NCI-N87 démontre un marquage positif pour la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ (D). Grossissement : A-C = 60, B = 120.

**Figure 17. Expression des marqueurs de différenciation
des cellules à mucus et des cellules pariétales dans la
lignée gastrique cancéreuse NCI-N87**



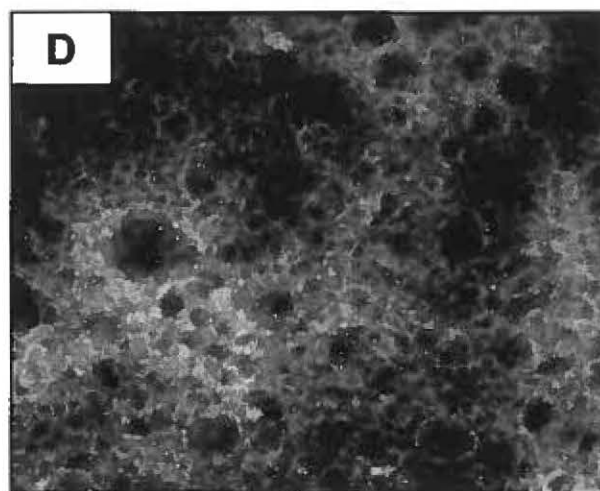
PAS à confluence



PAS à post-confluence



Mucine-6 à confluence



Sous-unité α de la pompe
 $H^+K^+ATPase$

4.4 Marqueurs des cellules principales.

Finalement, nous avons voulu vérifier la présence de marqueurs fonctionnels des cellules principales qui comme on le sait sont les cellules zymogéniques de l'estomac. Ainsi, afin de vérifier la présence des deux zymogènes gastriques, soit le pepsinogène-5 et la lipase gastrique humaine, nous avons tout d'abord utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte (figure 18). Suite à cette expérience, nous avons tout d'abord observé un marquage cytoplasmique diffus ubiquitaire à travers la monocouche de NCI-N87 tant pour le pepsinogène-5 (figure 18A) que pour la lipase gastrique (figure 18B). De plus, nous avons remarqué la présence de granules positifs pour le pepsinogène-5 et de lipase gastrique dans une sous-population de cellules.

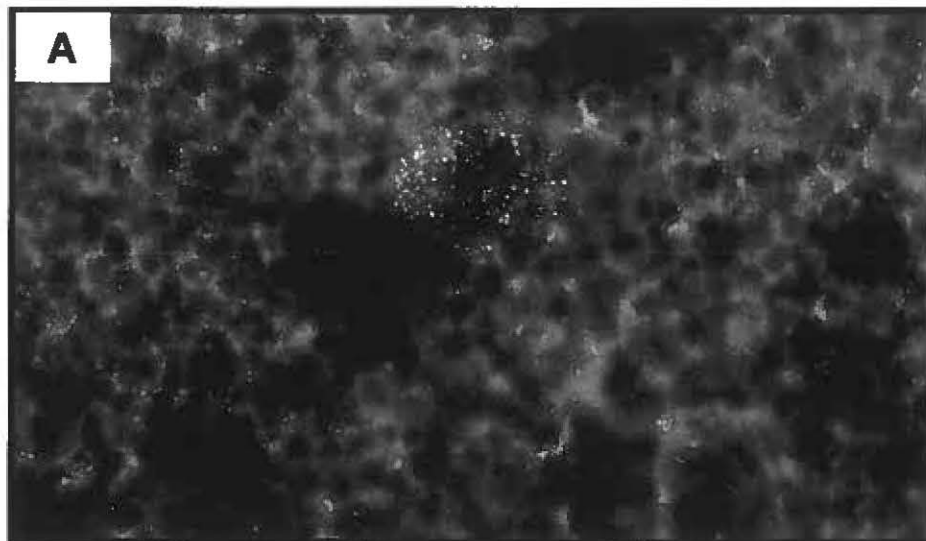
5. Capacité de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives.

Afin d'évaluer la capacité des cellules NCI-N87 à synthétiser et à sécréter les enzymes digestives de l'estomac, nous avons effectué des dosages enzymatiques. Dans un premier temps, ces dosages ont permis de confirmer que la lignée NCI-N87 était bel et bien capable de synthétiser et de sécréter les deux enzymes digestives. Puis dans un second temps, les dosages ont permis de constater que les formes enzymatiques synthétisées et sécrétées par les cellules étaient fonctionnelles (figures 19A et 19B). De plus,

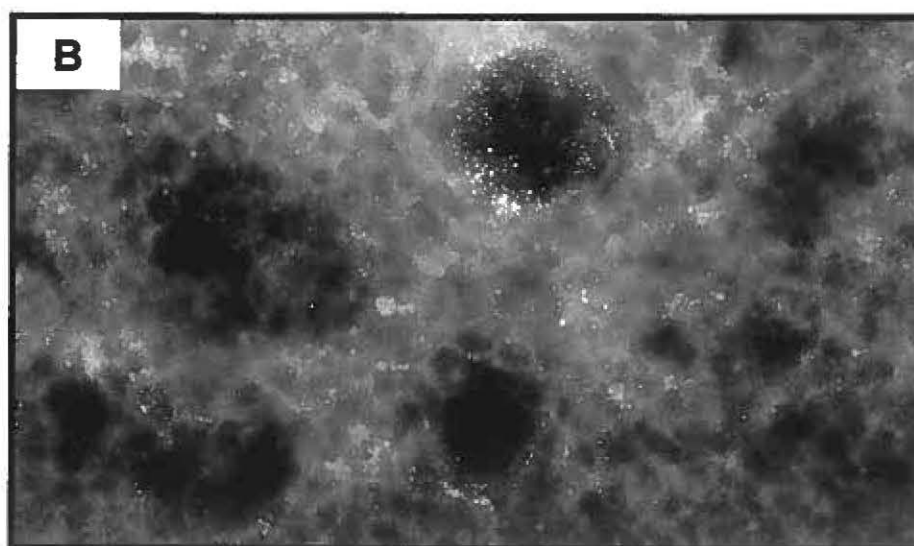
Figure 18: Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures confluentes de cellules NCI-N87 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps polyclonal dirigé contre le pepsinogène-5 ou la lipase gastrique humaine. Un marquage cytoplasmique diffus du pepsinogène-5 est observé sur la monocouche de cellules NCI-N97. Une sous-population de cellules positives pour Pg-5 démontre un marquage intense qui est granulaire (A). Les cellules NCI-N87 possèdent un marquage cytoplasmique intense pour la lipase gastrique. On dénote également un marquage intense sous forme granulaire dans une sous-population de cellules (B). Grossissement = 120.

Figure 18. Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87



Pepsine (Pg-5)



Lipase gastrique humaine (HGL)

Figure 19: Niveau de synthèse/sécrétion des enzymes digestives dans les lignées gastriques cancéreuses

L'activité spécifique de la pepsine (A) est mesurée dans les cellules (□) et dans les milieux (■) de culture de 4 lignées gastriques courantes lorsque les cellules sont à confluence. Les résultats sont exprimés en unités de pepsine par milligramme de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de trois expériences séparées. L'activité spécifique de la lipase gastrique (B) est mesurée dans les cellules (□) et dans les milieux (■) de culture de 4 lignées gastriques courantes lorsque les cellules sont à confluence. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides gras libres produits par minute par mg de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart type à la moyenne de trois expériences séparées. L'analyse par immunobuvardage de type Western (C) confirme la prédominance de lipase gastrique humaine dans la lignée NCI-N87 (A=AGS, H=Hs746t, K=Kato-III, N=NCI-N87).

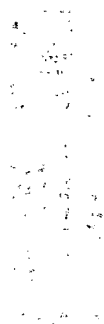
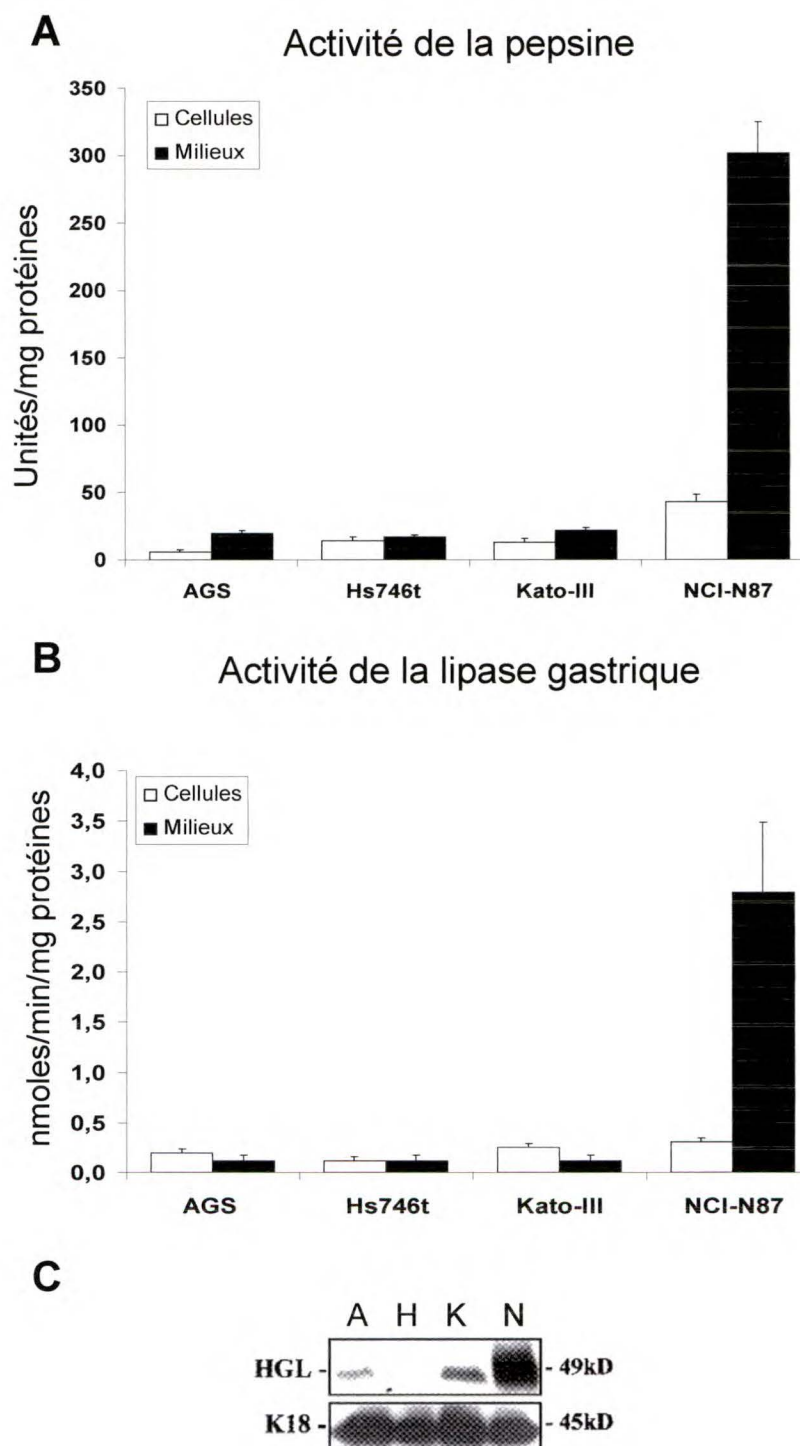


Figure 19. Niveau de synthèse/sécrétion des enzymes digestives dans les lignées gastriques cancéreuses



nous avons pu établir que les niveaux de pepsinogène-5 (figure 19A) et de lipase gastrique (figure 19B) synthétisés et sécrétés par les cellules NCI-N87 étaient de beaucoup supérieurs aux niveaux observés dans les lignées gastriques cancéreuses préalablement étudiées dans notre laboratoire (AGS, Hs746t, Kato-III). Ainsi, la lignée NCI-N87 devenait la première lignée gastrique cancéreuse à pouvoir sécréter de manière significative la lipase gastrique dans les milieux de culture (figure 19B). Finalement, la présence accrue de lipase gastrique humaine dans les cellules NCI-N87, en comparaison avec les autres lignées, a par la suite été confirmée à l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western (figure 19C).

6. Modulation de l'activité enzymatique à post-confluence.

Étant capable de cultiver les cellules NCI-N87 pendant 20 jours après l'atteinte de la confluence, nous avons voulu vérifier si la capacité de synthèse et de sécrétion des cellules était modulée au cours de cette période. Une fois de plus, on a donc effectué des dosages enzymatiques de pepsine et de lipase gastrique dans ces cellules à différents temps de culture (figures 20 et 21). Tout d'abord, on a constaté qu'avec la post-confluence les niveaux de pepsine demeurent inchangés tant dans les cellules (figure 20A) que dans les milieux de culture (figure 20B). Cependant, les niveaux de lipase gastrique demeurent constants dans les cellules (figure 21A) alors que le niveau de la sécrétion augmente avec la confluence pour atteindre un maximum de

Figure 20: Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87

L'activité spécifique de la pepsine est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à différents temps de culture, soit de la sous-confluence (sc) à 20 jours post-confluence. Les résultats sont exprimés en unités de pepsine par milligramme de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de six ou sept expériences séparées.

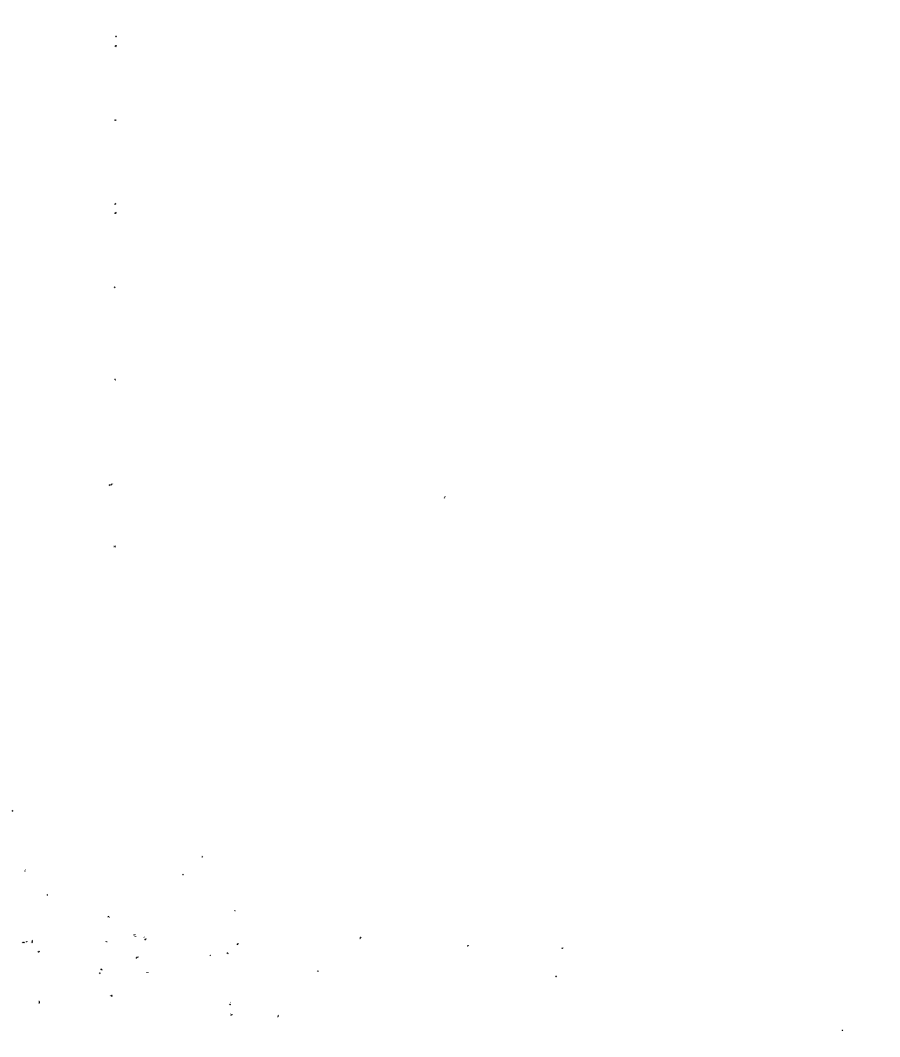


Figure 20. Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87

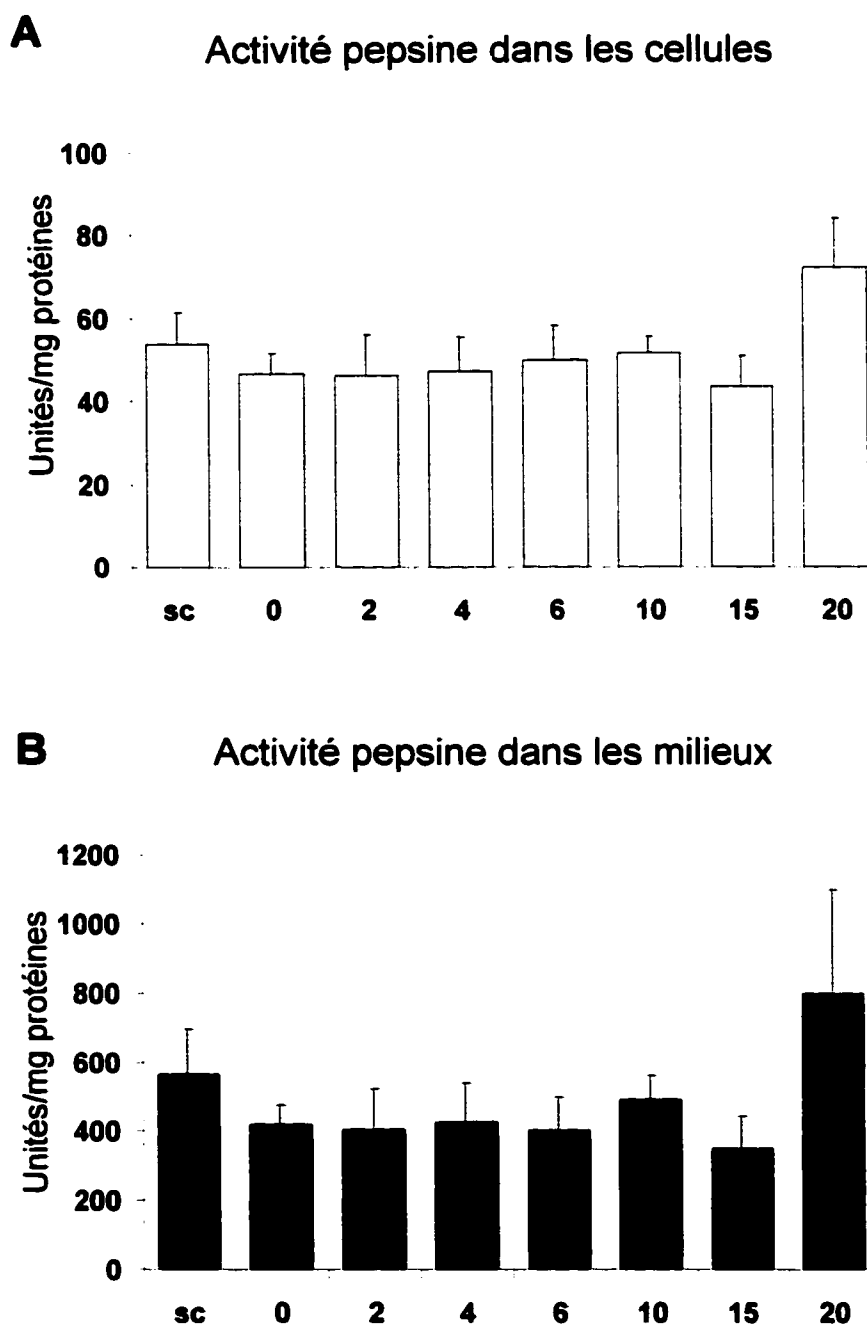
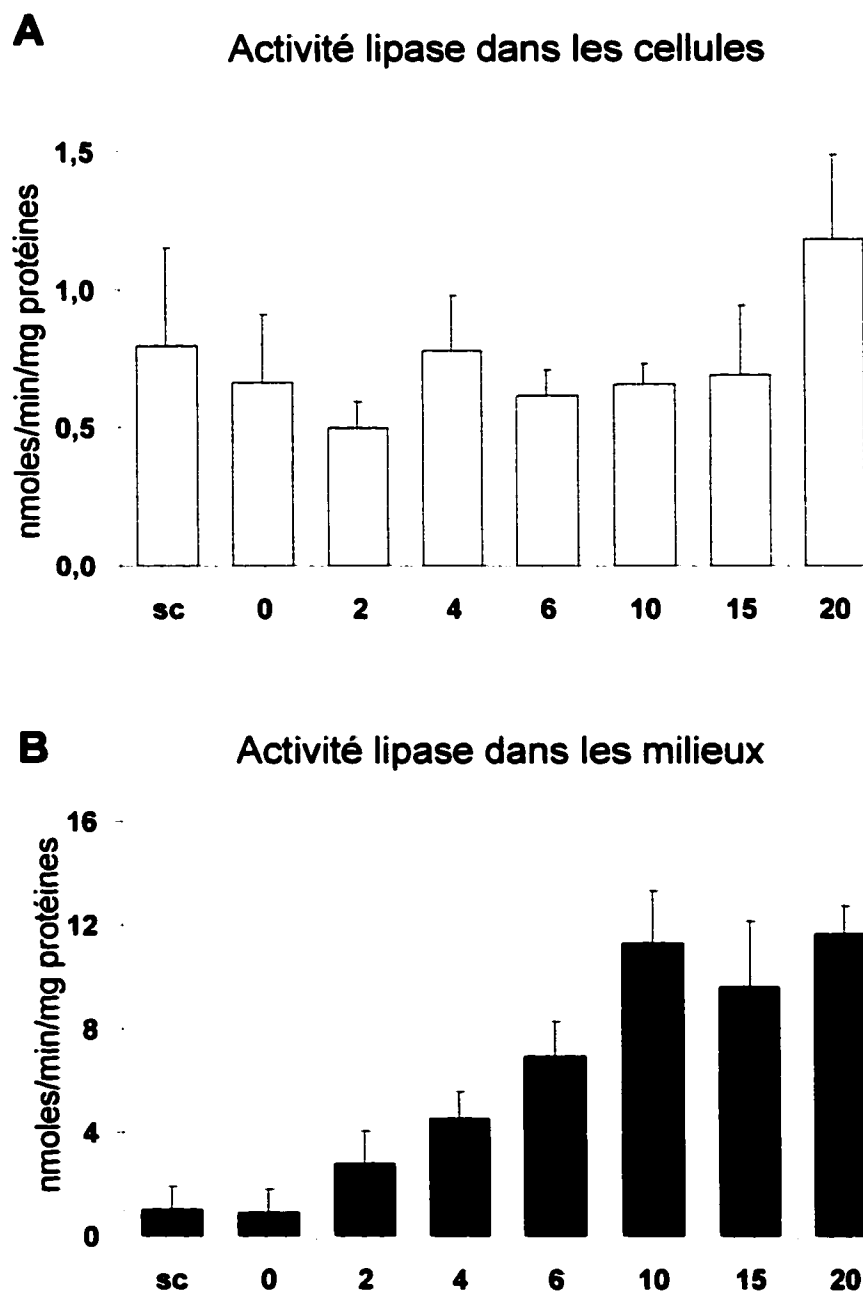


Figure 21: Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87

L'activité spécifique de la lipase gastrique est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à différents temps de culture soit de la sous-confluence (sc) à 20 jours post-confluence. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides gras libres produits par minute par mg de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart type à la moyenne de six ou sept expériences séparées.

Figure 21. Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique NCI-N87



sécrétion à 10 jours post-confluence qui se stabilise jusqu'à 20 jours post-confluence (figure 21B).

C) Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes.

1. Effet des modulateurs sur une culture confluente.

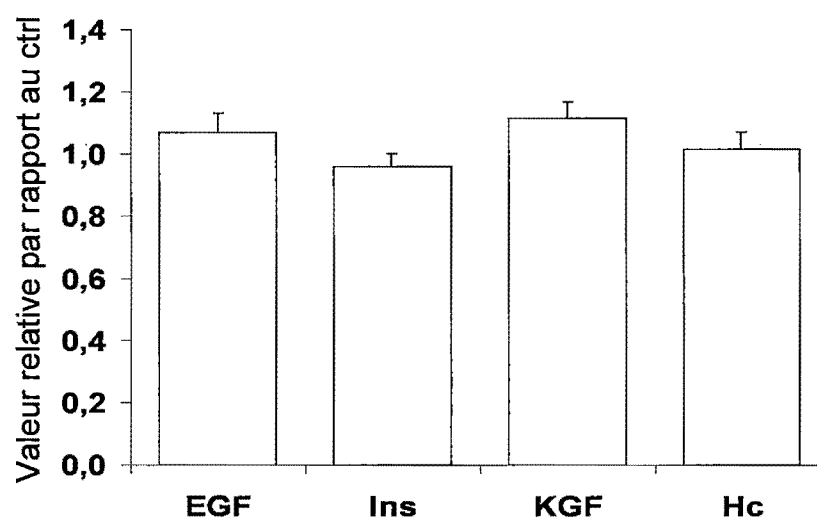
Afin de vérifier si des régulateurs exogènes pouvaient moduler l'activité de synthèse/sécrétion de nos cellules, nous avons cultivé ces dernières pendant 48 heures en présence des différents facteurs/hormones (EGF : 100 ng/ml, Ins : 5 µg/ml, KGF : 50 ng/ml et Hc : 1 µg/ml) puis nous avons dosé l'activité enzymatique obtenue dans les cellules ainsi que dans les milieux de culture (figures 22 et 23). Tout d'abord, nous avons constaté que l'ajout des différents modulateurs n'avait eu aucun effet sur la synthèse et la sécrétion de pepsine dans les cellules NCI-N87 (figure 22). Du côté de la lipase gastrique, nous avons observé une augmentation significative de celle-ci, tant dans les cellules (figure 23A) que dans les milieux de culture (figure 23B), lorsque les cellules étaient cultivées en présence du facteur de croissance EGF (augmentation de 1.6 fois et de 2.77 fois respectivement). Pour leur part, les autres régulateurs étudiés ne semblaient pas moduler significativement l'activité enzymatique des cellules.

Figure 22: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence

L'activité spécifique de la pepsine est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à confluence en absence de facteurs ou en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml) ou d'hydrocortisone (1µg/ml) après une incubation de 48 heures. Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes. Le contrôle a une valeur arbitraire de 1.

Figure 22. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence

A Variation de l'activité pepsine dans les cellules



B Variation de l'activité pepsine dans les milieux

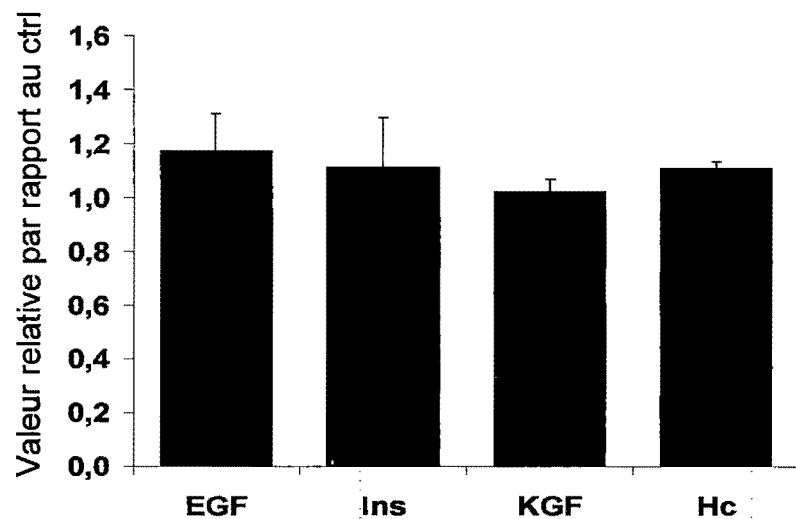
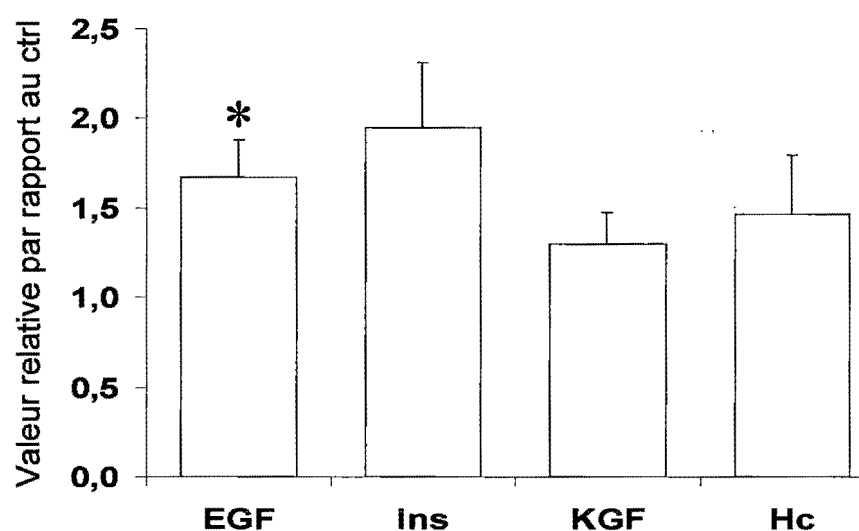


Figure 23: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence

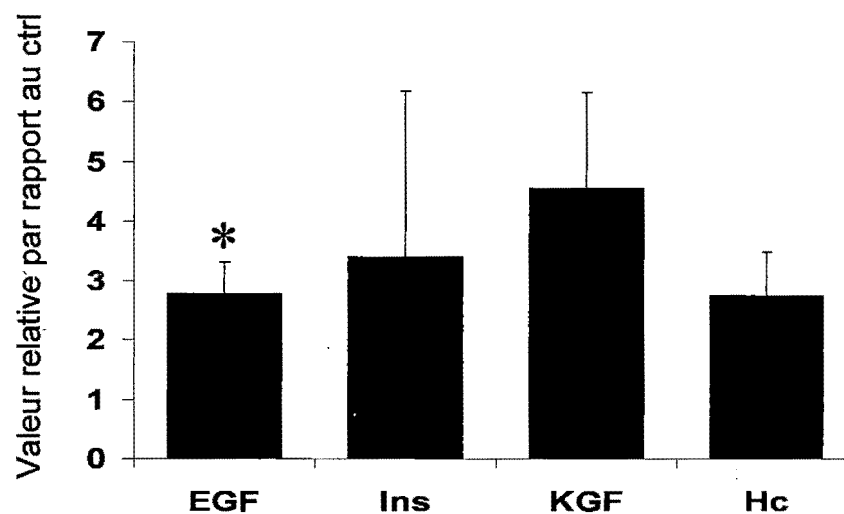
L'activité spécifique de la lipase gastrique est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à confluence en absence de facteurs ou en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml) ou d'hydrocortisone (1µg/ml) après une incubation de 48 heures. Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle et ils représentent la moyenne ± l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes. Le contrôle a une valeur arbitraire de 1. * P < 0,05.

Figure 23. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à confluence

A Variation de l'activité lipase dans les cellules



B Variation de l'activité lipase dans les milieux



2. Effet des modulateurs sur une culture à six jours post-confluence.

Des cultures de cellules à six jours post-confluence ont été incubées pendant 48 heures en présence de divers facteurs ou hormones (EGF : 100 ng/ml, Ins : 5 µg/ml, KGF : 50 ng/ml et Hc : 1 µg/ml) afin de vérifier l'effet de ces derniers sur l'activité enzymatique des cellules. Ainsi, suite aux dosages enzymatiques de la pepsine et de la lipase gastrique dans les cellules et les milieux de culture, nous avons constaté que ces modulateurs potentiels n'avaient aucun effet significatif sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des deux enzymes gastriques bien que l'activité de la lipase tende à diminuer, notamment en présence d'EGF (figures 24 et 25). Les effets positifs de l'EGF préalablement observés à confluence ne sont donc pas reproduits dans une culture à post-confluence.

D) Caractérisation d'un système de co-culture NCI-N87/HGE.34.

1. Morphologie cellulaire de la co-culture.

Afin de vérifier l'effet d'interactions épithélio-mésenchymateuses, nous avonsensemencé les cellules NCI-N87 sur une monocouche confluyente de fibroblastes gastriques foetaux (HGM.34) (figure 26A). Ainsi, nous avons pu constater qu'une fois ensemencées sur les fibroblastes, les cellules NCI-N87 ne forment pas de monocouche mais elles s'organisent plutôt en colonies

Figure 24: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à post-confluence

L'activité spécifique de la pepsine est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à six jours post-confluence en absence de facteurs en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml) ou d'hydrocortisone (1µg/ml) après une incubation de 48 heures. Les résultats sont exprimés en unités de pepsine par milligramme de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de six expériences séparées.

Figure 24. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans la lignée gastrique NCI-N87 à post-confluence

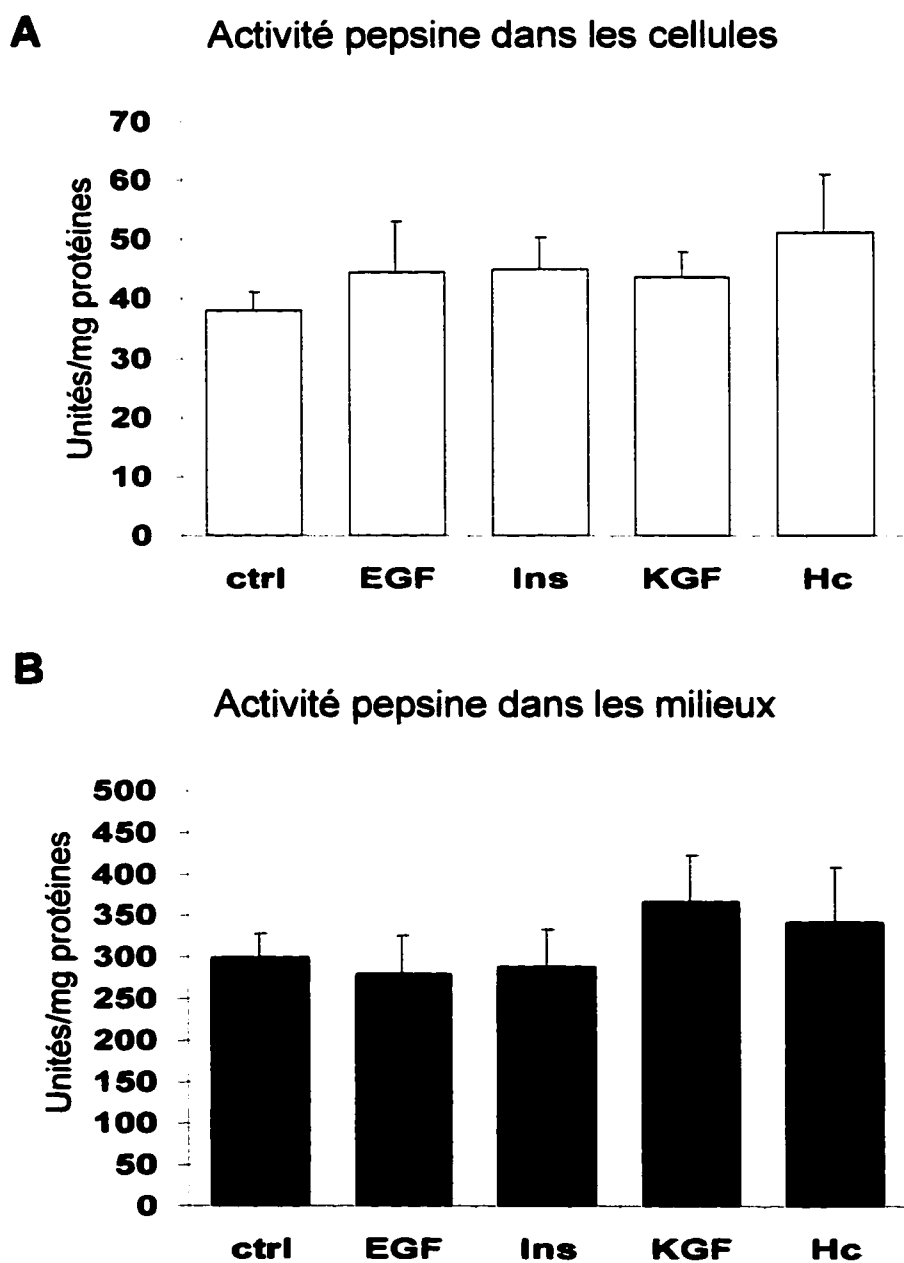


Figure 25: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à post-confluence

L'activité spécifique de la lipase gastrique est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des NCI-N87 à six jours post-confluence en absence de facteurs ou en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml) ou d'hydrocortisone (1µg/ml) après une incubation de 48 heures. Les résultats sont exprimés en nmoles d'acides gras libres produits par minute par mg de protéines et ils représentent la moyenne ± l'écart type à la moyenne de six expériences séparées.

Figure 25. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans la lignée gastrique NCI-N87 à post-confluence

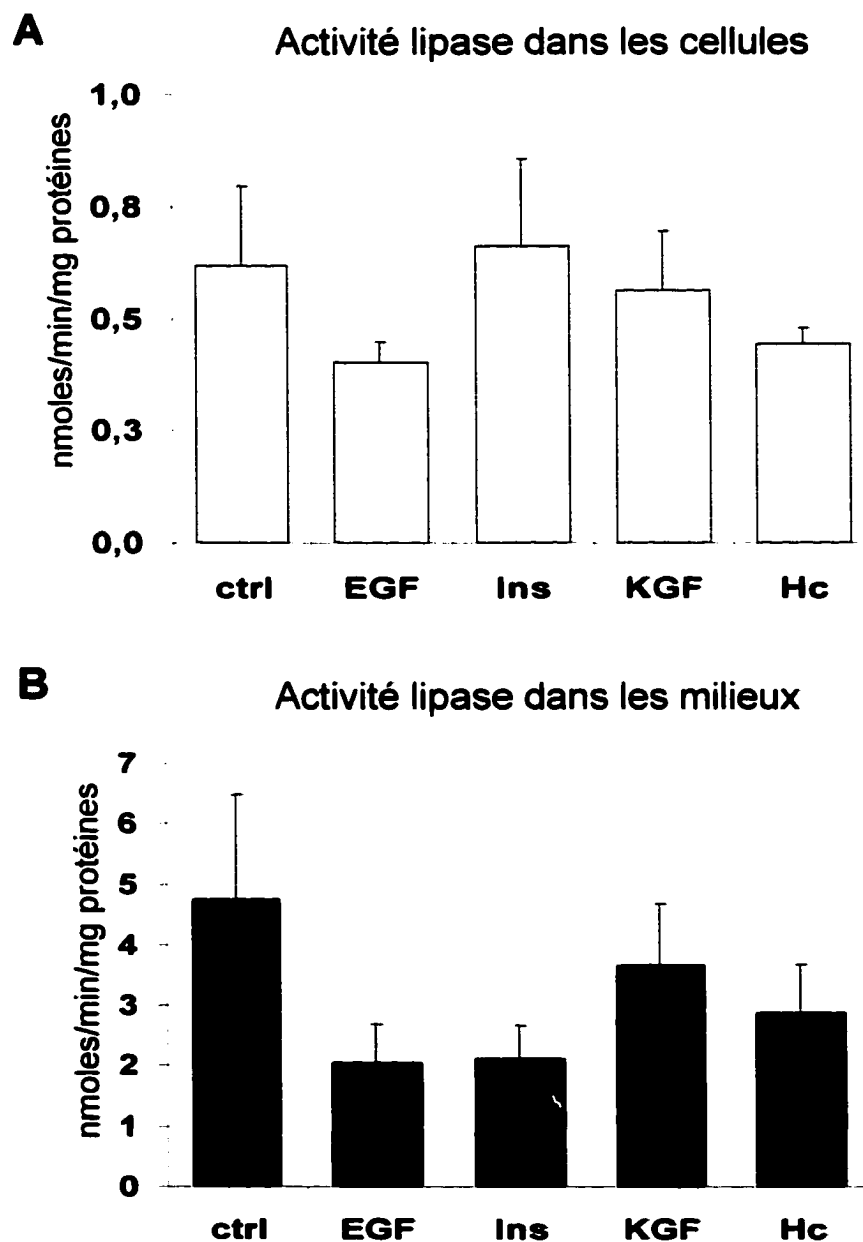
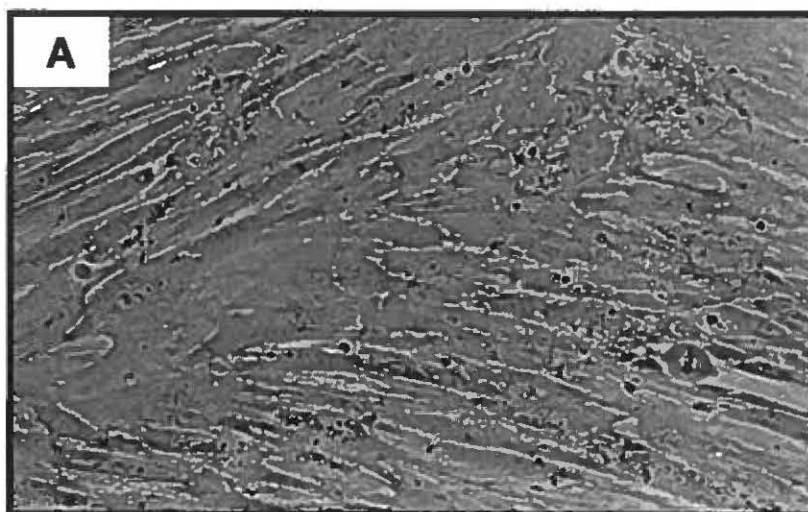


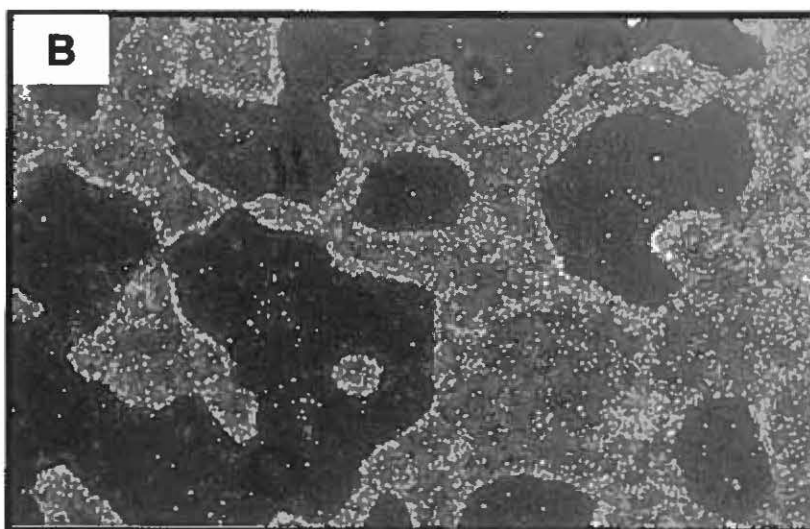
Figure 26: Morphologie cellulaire d'une co-culture de NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux

Morphologie cellulaire en contraste de phase d'une monocouche de fibroblastes gastriques fœtaux HGM.34 (A) à confluence et d'une co-culture de HGM.34 et de cellules NCI-N87 (B). Les cellules HGM.34 forment une monocouche dont le phénotype allongé est caractéristique de la lignée fibroblastique (A). Ensemencées sur une monocouche de HGM.34, les cellules NCI-N87 forment des agrégats serrés où l'attachement individuel des cellules est nettement amélioré : le détachement cellulaire n'est plus visible en comparaison aux cultures sur plastique (B). Grossissement : A = 120, B = 16.

**Figure 26. Morphologie cellulaire d'une co-culture de
NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux**



Lignée HGM.34



Cellules HGM.34 + cellules NCI-N87

compactes (figure 26B). De plus, nous avons remarqué que contrairement à la culture sur plastique, les colonies de NCI-N87 ainsi organisées sont stables. Il n'y a donc plus de détachement spontané et de renouvellement continuels comme c'est le cas dans une culture sur plastique.

2. Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes.

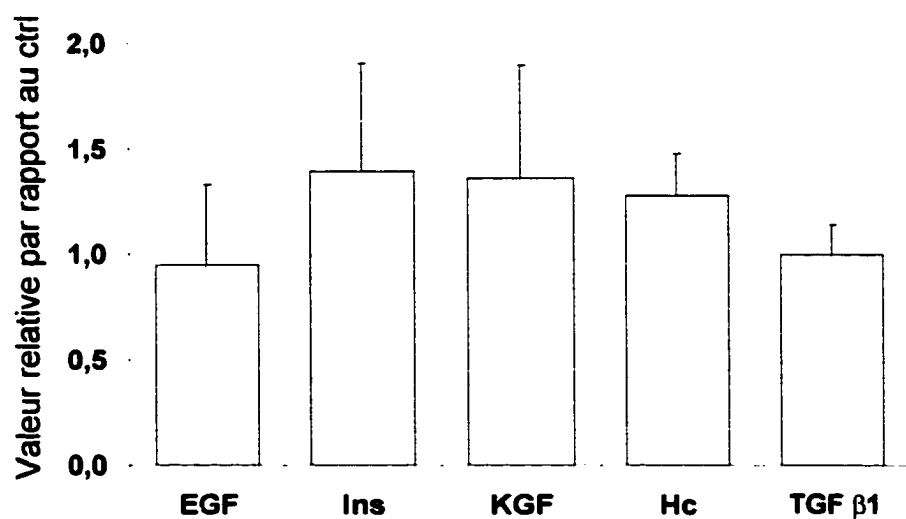
Nous avons vérifié l'effet de différents facteurs de croissance ou hormones sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des enzymes gastriques. Les facteurs ou hormones (EGF : 100 ng/ml, Ins : 5 µg/ml, KGF : 50 ng/ml, TGFβ1 : 1 ng/ml et Hc : 1 µg/ml) ont donc été ajoutés 2 heures après l'ensemencement des NCI-N87 sur la monocouche confluite de HGM.34 pour une période de 36 heures. Les dosages enzymatiques de pepsine ont montré que les facteurs de croissance EGF et KGF diminuent significativement les niveaux de sécrétion de pepsine dans les milieux de culture (figure 27B). Cependant, aucun des facteurs ou hormones étudiés n'a permis de moduler l'activité pepsine dans les cellules (figure 27A). Du côté de la lipase gastrique, seul le facteur de croissance EGF a modulé significativement à la baisse l'activité enzymatique dans les cellules (figure 28A); aucune variation significative n'a été observée dans les milieux de culture (figure 28B).

Figure 27: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux

L'activité spécifique de la pepsine est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de la co-culture 36 heures après l'ensemencement des NCI-N87 sur la monocouche de fibroblastes gastriques fœtaux en absence de facteurs ou en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml), d'hydrocortisone (1µg/ml) ou de TGFβ1 (1 ng/ml). Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle et ils représentent la moyenne ± l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes à l'exception du TGFβ1 (cinq expériences). Le contrôle a une valeur arbitraire de 1. * P < 0,05.

Figure 27. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de pepsine dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux

A Variation de l'activité pepsine dans les cellules



B Variation de l'activité pepsine dans les milieux

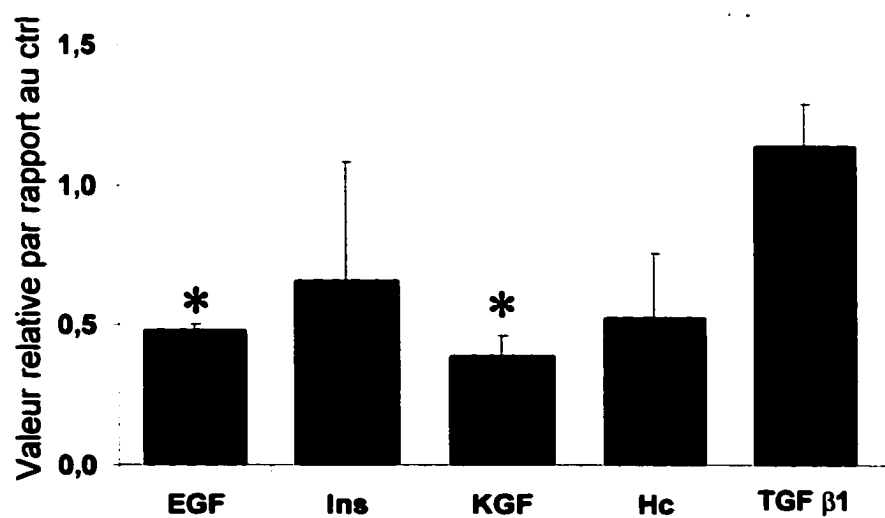
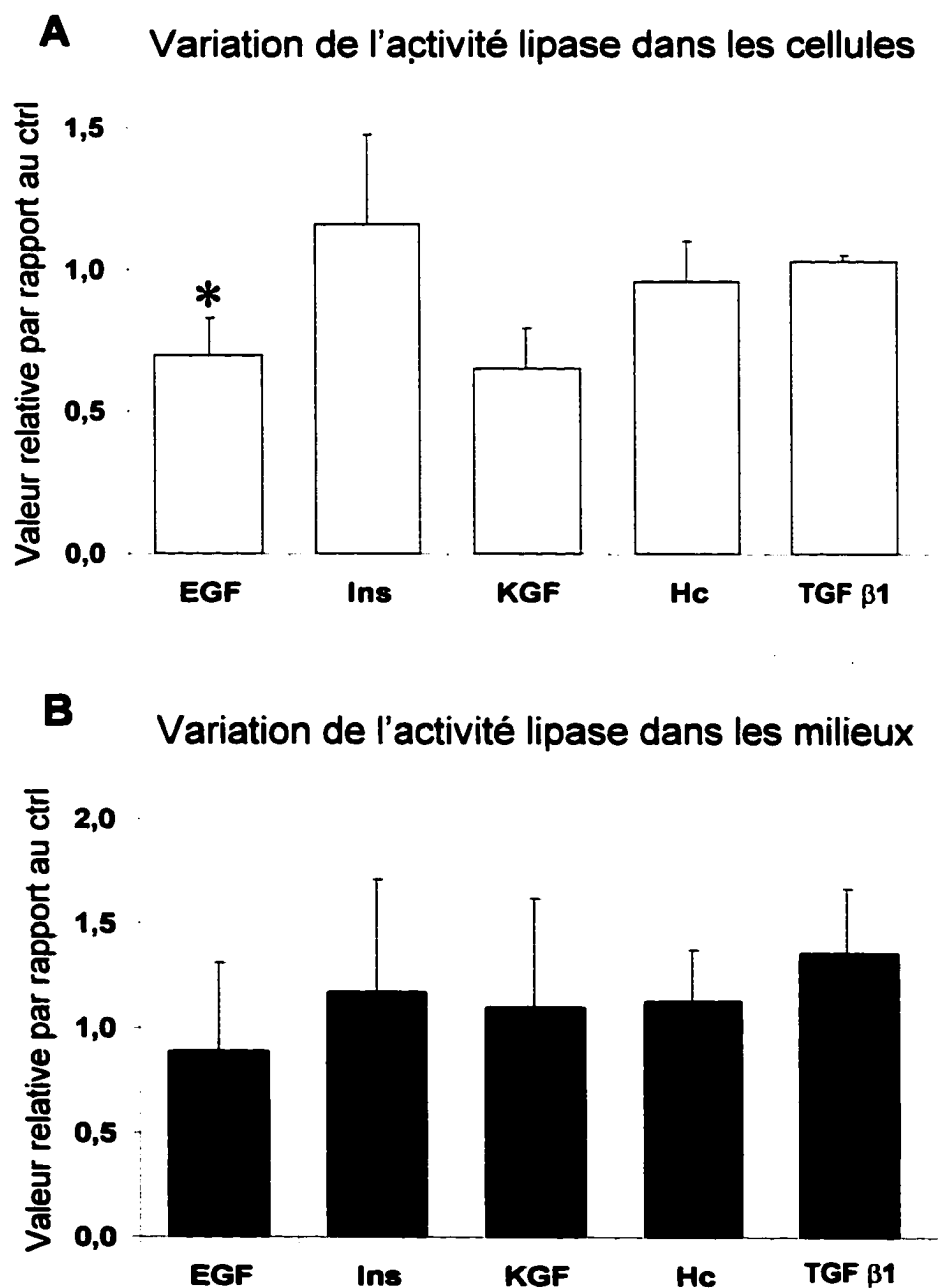


Figure 28: Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux

L'activité spécifique de la lipase gastrique est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de la co-culture 36 heures après l'ensemencement des NCI-N87 sur la monocouche de fibroblastes gastriques fœtaux en absence de facteurs ou en présence d'EGF (100 ng/ml), d'insuline (5 µg/ml), de KGF (50 ng/ml), d'hydrocortisone (1µg/ml) ou de TGFβ1 (1 ng/ml). Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle et ils représentent la moyenne ± l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes à l'exception du TGFβ1 (cinq expériences). Le contrôle a une valeur arbitraire de 1. * P < 0,05.

Figure 28. Effet des facteurs de croissance, de l'insuline et de l'hydrocortisone sur les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique dans une co-culture de cellules NCI-N87 et de fibroblastes gastriques fœtaux



E) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse HGE.20

1. Morphologie cellulaire.

Les cellules HGE.20 exhibent un phénotype polygonal qui est homogène à travers la monocouche en culture (figure 29). Les HGE.20 forment des colonies compactes lorsqu'elles sont ensemencées sur plastique. À confluence, elles forment une monocouche dense et cohérente. Contrairement à la lignée mère (NCI-N87), la monocouche formée par les cellules HGE.20 en culture est plus stable : adhérence optimisée et peu de détachement. De plus, tout comme les NCI-N87, les cellules HGE.20 peuvent être maintenues à post-confluence.

2. Marqueurs des jonctions cellulaires.

Le statut de polarisation de la lignée HGE.20 a été évalué à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte en vérifiant l'expression de certains marqueurs de polarisation épithéliale. Ces marqueurs sont la cadhérine-E, protéine associée aux *zonulae adherens*, et la ZO-1 associée aux *zonulae occludens*. Tout comme la lignée mère, les HGE.20 démontrent un marquage positif à la cadhérine-E au niveau de leurs sites de contacts cellule-cellule et ce, tant à sous-confluence qu'à confluence (résultats non présentés). En plus de la présence de cadhérine-E, la monocouche est entièrement positive pour

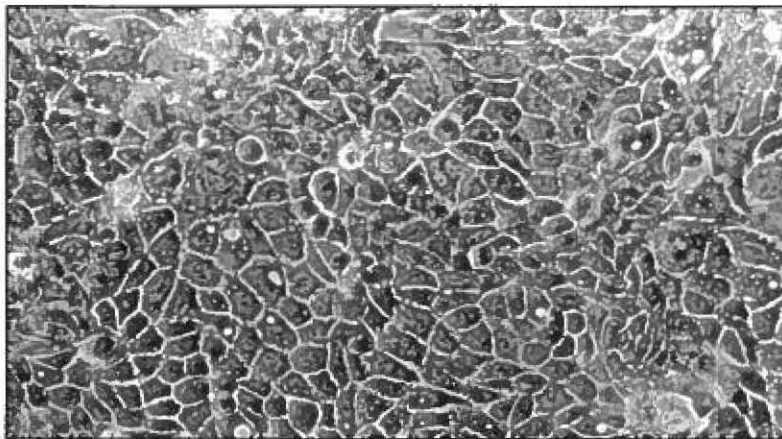
Figure 29: Morphologie cellulaire de la nouvelle lignée gastrique cancéreuse HGE.20 clonée à partir de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87

Morphologie cellulaire en contraste de phase d'une monocouche de cellules HGE.20 à 4 jours post-confluence. Cultivées sur plastique, les HGE.20 forment une monocouche cohérente lorsqu'elles atteignent la confluence. Les HGE.20 possèdent un phénotype épithélial homogène. Grossissement = 120.

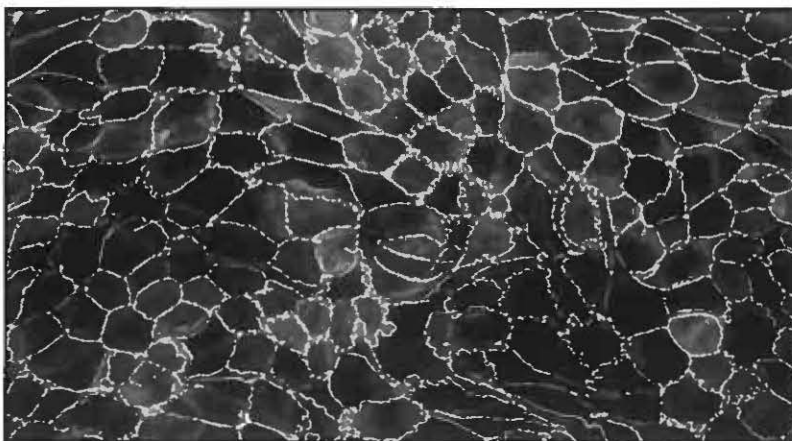
Figure 30: Expression et distribution des marqueurs de jonctions cellulaires dans la lignée gastrique cancéreuse HGE.20

Micrographie en immunofluorescence indirecte d'une culture confluyente de cellules HGE.20 sur des lamelles de verre marquées à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ZO-1 qui est un marqueur des jonctions étanches. À confluence, la protéine ZO-1 est détectée aux contacts cellule-cellule dans la monocouche entière. Grossissement = 120.

**Figure 29. Morphologie cellulaire de la nouvelle lignée
gastrique cancéreuse HGE.20 clonée à partir de la
lignée gastrique cancéreuse NCI-N87**



**Figure 30. Expression et distribution des marqueurs de
jonctions cellulaires dans la lignée HGE.20**



la protéine ZO-1 qui est un marqueur des jonctions étanches (figure 30). Cette protéine semble très bien assemblée à la périphérie des cellules ce qui laisse supposer que les HGE.20 sont plus polarisées que la lignée NCI-N87 où seulement une sous-population des cellules exprimait la ZO-1.

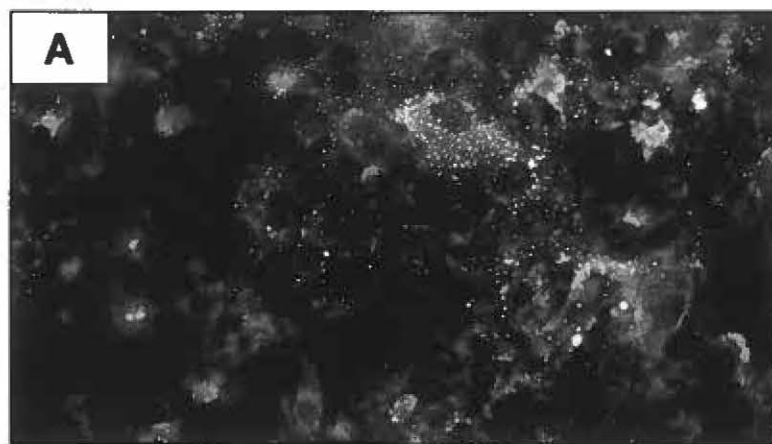
3. Marqueurs de différenciation des cellules principales.

Afin de vérifier si nous avons sélectionné le phénotype zymogénique lors de nos clonages, nous avons validé la présence de marqueurs fonctionnels des cellules zymogéniques de l'estomac. Pour y arriver, nous avons tout d'abord utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte (figure 31) afin de vérifier s'il y avait présence de pepsinogène-5 et de lipase gastrique dans la lignée HGE.20. Suite à cette expérience, nous avons tout d'abord observé qu'en comparaison avec la lignée NCI-N87 le marquage au niveau du cytoplasme des cellules était de beaucoup diminué tant pour le pepsinogène-5 (figure 31A) que pour la lipase gastrique (figure 31B). Par contre, nous avons remarqué une augmentation du marquage granulaire pour les deux enzymes gastriques. Ainsi, dans les HGE.20 il y a présence de pepsinogène-5 sous forme de petits granules très denses (figure 31A) alors que l'immunoréactivité de la lipase gastrique semble associée à des granules plus gros et moins denses (figure 31B).

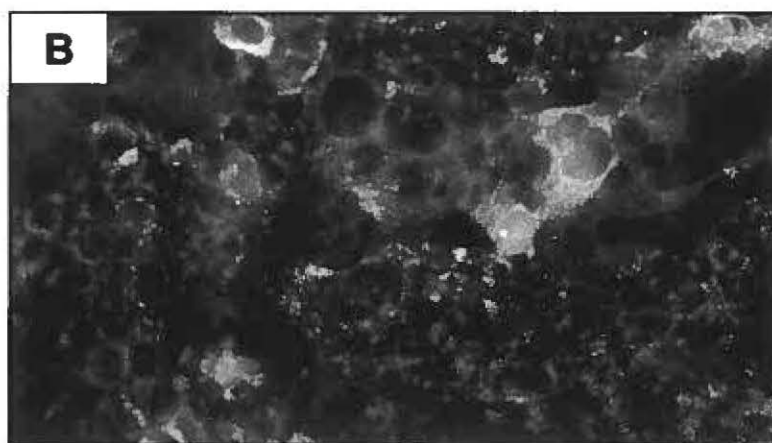
Figure 31: Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse HGE.20

Micrographie en immunofluorescence indirecte de cultures confluentes de cellules HGE.20 sur des lamelles de verre marquées avec un anticorps polyclonal dirigé contre le pepsinogène-5 ou la lipase gastrique humaine. Un marquage granulaire dense et intense est observé pour le pepsinogène-5 sur la monocouche de cellules HGE.20. Une sous-population de cellules possède un marquage cytoplasmique diffus (A). On dénote la présence de granules diffus de lipase gastrique dans la monocouche de HGE.20. On remarque également un faible marquage cytoplasmique dans une sous-population de cellules (B). Grossissement = 120.

Figure 31. Expression et distribution des enzymes digestives dans la lignée gastrique cancéreuse HGE.20



Pepsine (Pg-5)



Lipase gastrique humaine (HGL)

4. Capacité de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives et modulation de celles-ci à post-confluence.

Afin d'évaluer la capacité des cellules HGE.20 à synthétiser et à sécréter les enzymes gastriques en culture, nous avons effectué des dosages enzymatiques. Dans un premier temps, ces dosages ont permis de confirmer que, tout comme la lignée NCI-N87, la lignée HGE.20 était bel et bien capable de synthétiser et de sécréter les deux enzymes digestives sous leur forme fonctionnelle (figures 32 et 33). Par la suite, nous avons pu constater que les niveaux de pepsinogène-5 (figure 32) et de lipase gastrique (figure 33) synthétisés et sécrétés par les cellules HGE.20 étaient comparables aux niveaux obtenus dans la lignée NCI-N87 à 10 jours post-confluence (figure 20 et 21 respectivement). Tout comme dans la lignée NCI-N87, les niveaux de pepsine ne varient pas de manière significative avec la post-confluence des cellules HGE.20. Cette affirmation vaut tant pour les niveaux cellulaires (figure 32A) que les niveaux sécrétés dans les milieux de culture (figure 32B). Cependant, on observe tout de même une tendance de modulation à la baisse. Du côté de la lipase gastrique, on observe une modulation à la baisse qui est significative dans les cellules HGE.20 (figure 32A) contrairement aux cellules NCI-N87 où les niveaux de lipase gastrique cellulaire demeuraient relativement constants (figure 21A). De plus, alors que la capacité de sécrétion des NCI-N87 augmentait avec la post-confluence (figure 21B), les

Figure 32: Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20

L'activité spécifique de la pepsine est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des HGE.20 à différents temps de culture soit de la confluence à 10 jours post-confluence. Les résultats sont exprimés en unités de pepsine par milligramme de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de trois expériences séparés à l'exception de la sous-confluence (six expériences).

Figure 32. Niveau de synthèse et de sécrétion de pepsine à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20

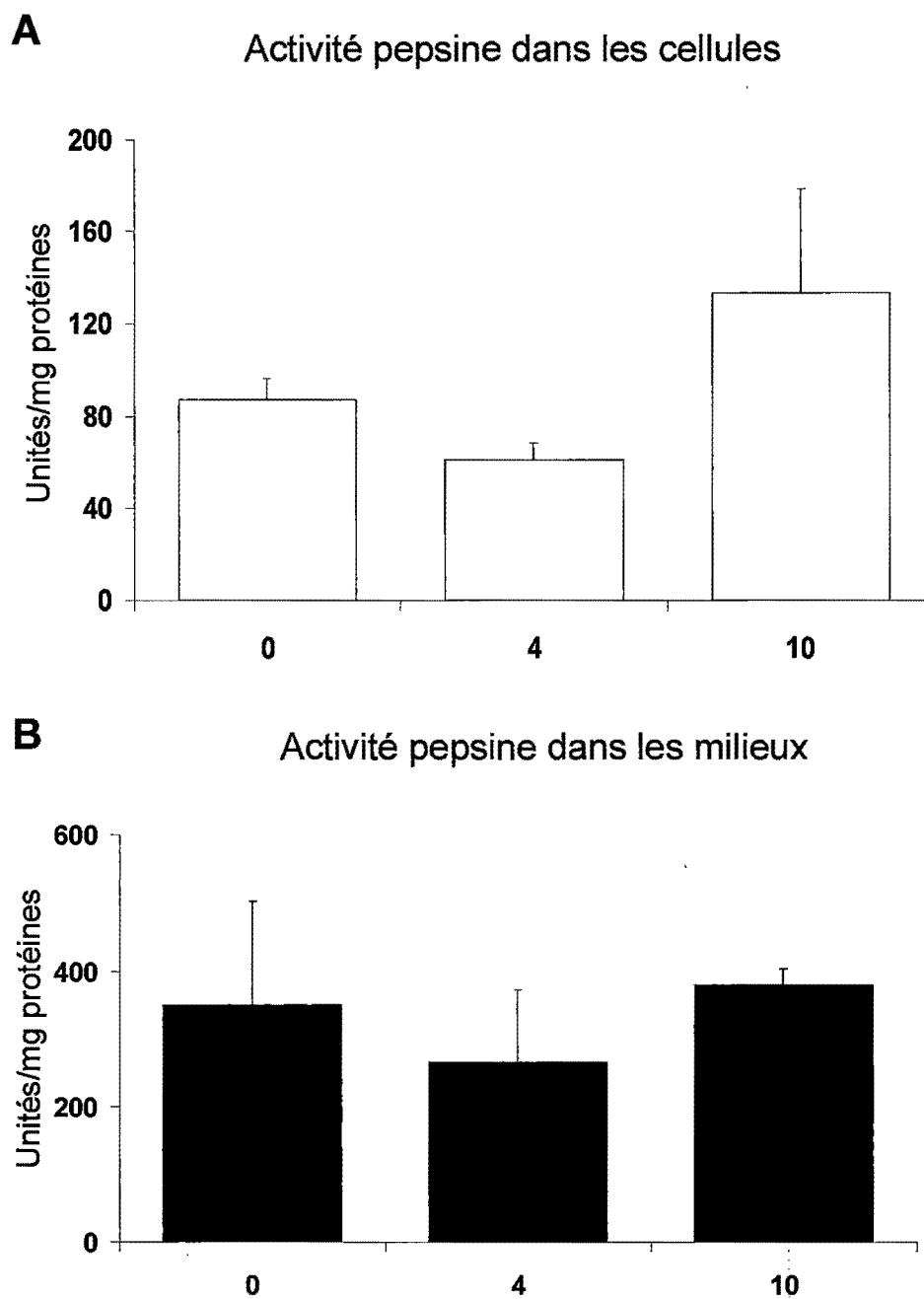
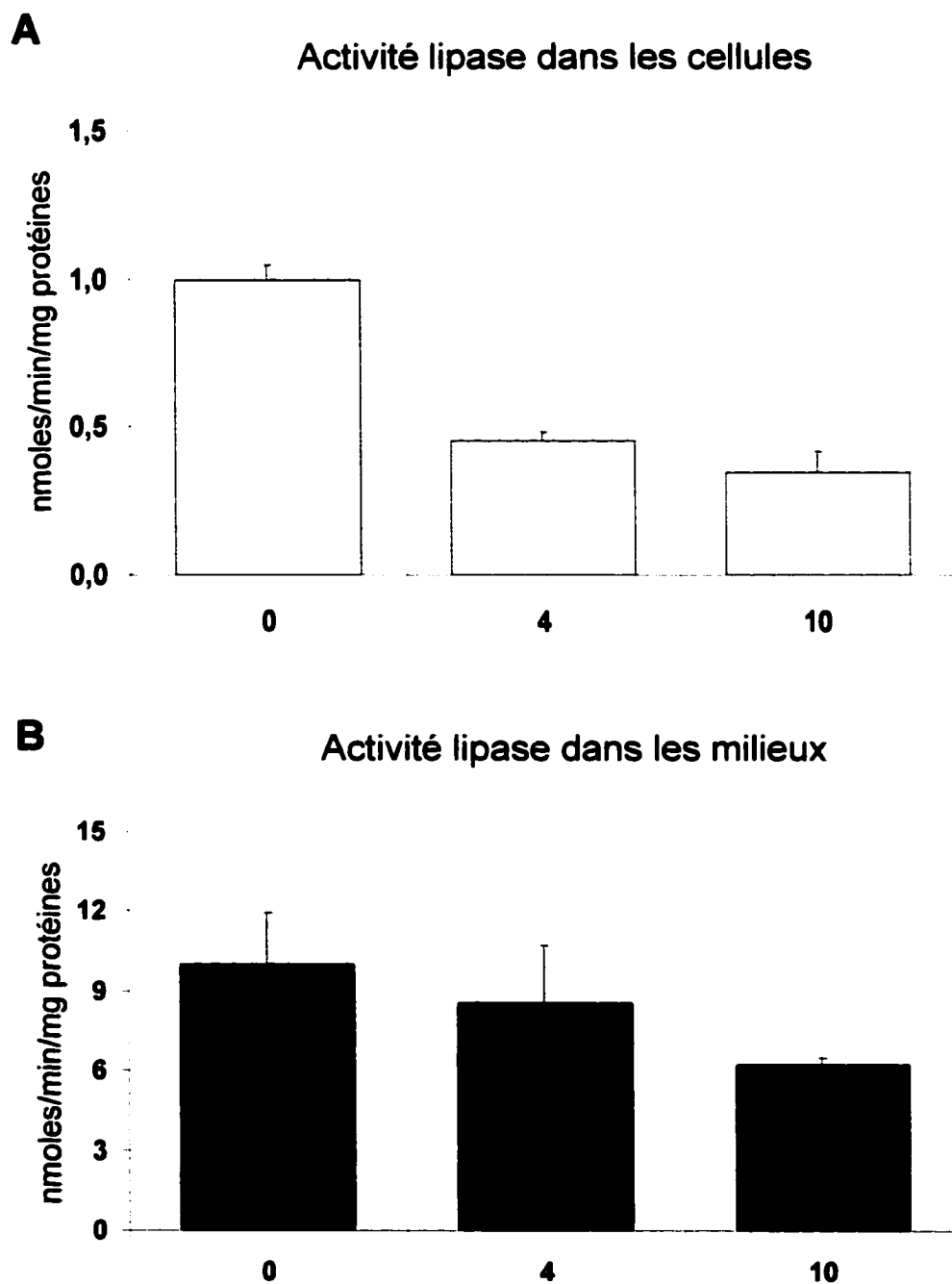


Figure 33: Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20

L'activité spécifique de la lipase gastrique est mesurée dans les cellules (A) et dans les milieux (B) de culture des HGE.20 à différents temps de culture, soit de la confluence à 10 jours post-confluence. Les résultats sont exprimés en nmole d'acides gras libres par minute par mg de protéines et ils représentent la moyenne \pm l'écart type à la moyenne de trois expériences séparées à l'exception de la sous-confluence (six expériences).

**Figure 33. Niveau de synthèse et de sécrétion de lipase
gastrique à post-confluence dans la lignée gastrique HGE.20**



niveaux d'enzymes sécrétés dans les milieux de culture par les HGE.20 demeurent constants avec la post-confluence (figure 33B).

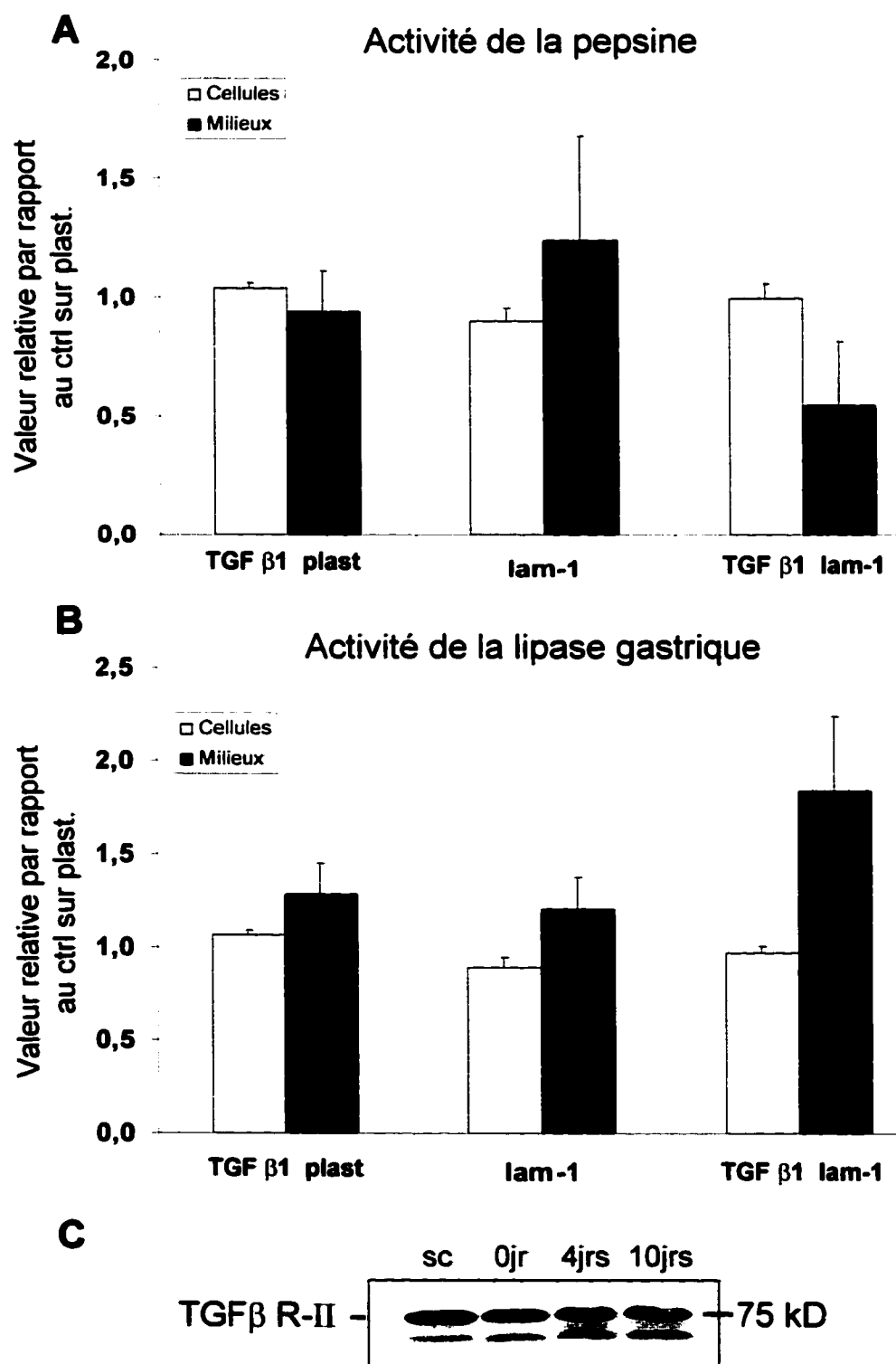
5. Modulation de l'activité enzymatique par la laminine-1 et/ou le TGF β 1.

Après avoir confirmé la présence des récepteurs II du TGF β dans les cellules HGE.20 par immunobuvardage de type Western (figure 34C) ainsi que par immunofluorescence indirecte (figure 34D), des cellules HGE.20 ont été cultivées sur une matrice de laminine-1 ou sur plastique. À 4 jours post-confluence, les cellules ont été mises en présence ou non de TGF β 1 pour une période de 36 heures afin de vérifier l'effet de ces deux molécules, seules ou en combinaison, sur l'activité enzymatique cellulaire (figure 34). Ainsi, suite aux dosages enzymatiques de la pepsine et de la lipase gastrique dans les cellules et les milieux de culture, nous avons constaté que les niveaux de pepsine ne sont pas affectés par la présence de ces deux molécules en solo ou en combinaison (figure 34A). De leurs côtés, les niveaux de synthèse et de sécrétion de lipase gastrique ne sont pas augmentés par l'ajout d'une seule de ces deux molécules. Cependant, il semble y avoir une tendance de stimulation de la sécrétion, lorsque les cellules sont cultivées en présence de laminine-1 et de TGF β 1 (figure 34B).

Figure 34: Effet de la laminine-1 et/ou du TGF β 1 sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives dans la lignée gastrique HGE.20

L'activité spécifique de la pepsine (A) est mesurée dans les cellules (□) et dans les milieux (■) de culture de HGE-20 ensemencées ou non sur une matrice de laminine-1 et en présence ou non de TGF β 1. Les cellules ont été incubées 36 heures en présence du facteur de croissance. Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle cultivé sur plastique sans TGF β 1 et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes. Le contrôle a une valeur arbitraire de 1. L'activité spécifique de la lipase gastrique (B) est mesurée dans les cellules (□) et dans les milieux (■) de culture de HGE-20 ensemencées ou non sur une matrice de laminine-1 et en présence ou non de TGF β 1. Les cellules ont été incubées 36 heures en présence du facteur de croissance. Les résultats sont exprimés en valeurs relatives par rapport au contrôle sur plastique sans TGF β 1 et ils représentent la moyenne \pm l'écart-type à la moyenne de trois expériences différentes. Le contrôle a une valeur arbitraire de 1. L'analyse par immunobuvardage de type Western (C) confirme la présence du récepteur II du TGF β dans la lignée HGE.20 à différents jours de confluence. Finalement, l'immunofluorescence indirecte du récepteur II du TGF β démontre une présence majoritaire de ce dernier au niveau du cytoplasme des cellules HGE.20 (D).

Figure 34. Effet de la laminine-1 et/ou du TGF β 1 sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des enzymes digestives dans la lignée gastrique HGE.20



IV. DISCUSSION

A) Localisation de la sous-unité $\alpha 3$ de la laminine-5 et des sous-unités des intégrines dans l'estomac fœtal humain en développement.

Dans ce premier volet, nous avons tout d'abord voulu compléter la localisation des laminines au niveau de la membrane basilaire de l'estomac fœtal humain puisque des études précédentes, effectuées dans notre laboratoire, suggèrent que les laminines jouent un rôle important dans le développement des glandes gastriques. Par exemple, les chaînes $\alpha 1/\alpha 5$ constituant les laminines-1/10 sont détectées à la base de l'épithélium entier, à tous les stades de la morphogénèse alors que la chaîne $\alpha 2$ de la laminine-2 apparaît plus tardivement à la base des glandes en formation (Tremblay et Ménard, 1996). En outre, nous avons établi la localisation précise des récepteurs de type intégrine médiant la liaison des cellules épithéliales aux laminines.

Au niveau des glandes de type fundique, reconnues pour sécréter mucus, HCl et zymogènes (lipase gastrique et pepsinogène), les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 1$ des intégrines sont exprimées dans la totalité de l'épithélium gastrique. Plus précisément, ces deux sous-unités sont détectées dès 8 semaines de gestation lorsque l'épithélium gastrique est encore stratifié et indifférencié. Quoique les glandes de type antral assument des fonctions quelque peu différentes de celles accomplies par les glandes de type fundique

(sécrétion de gastrine et de mucus surtout), des observations similaires ont été rapportées quant à la localisation des sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 1$ dans ce type glandulaire. Ces derniers résultats fournissent des indications supplémentaires supportant l'idée que les intégrines formées de la sous-unité $\alpha 6$ pourraient agir à titre de médiateur des laminines et ainsi permettre l'initiation de la différenciation primaire de tous les types épithéliaux gastriques ou le maintien du phénotype différencié. Ainsi, les laminines 1 et 10 pourraient servir de ligand à ces récepteurs puisque les chaînes $\alpha 1/\alpha 5$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ de ces laminines sont aussi retrouvées de manière ubiquitaire dans chacun des compartiments gastriques et ce, autant chez le fœtus (Tremblay et Ménard, 1996) que chez l'adulte (Virtanen et al., 1995).

Dans les glandes de type fundique, les sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 4$ des intégrines sont concentrées au niveau des cellules épithéliales à mucus de surface et fovéolaires. Cette localisation concorde avec celle observée pour la chaîne $\alpha 3$ composant les laminines 5-6 et 7. On soupçonne donc les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ de servir de récepteurs aux laminines constituées de la chaîne $\alpha 3$. Elles pourraient par le fait même permettre la différenciation des cellules à mucus de surface. Il est vrai que le marquage de la sous-unité $\beta 4$ des intégrines et de la chaîne $\alpha 3$ des laminines diminue en intensité de la surface vers la base des glandes en formation. Cette situation diffère de ce qui est observé chez l'adulte où ces protéines sont restreintes à l'épithélium de surface (Virtanen et al., 1995). Cette variation pourrait donc illustrer l'implication possible de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et de la laminine-5 dans les

événements permettant de réguler la morphogénèse des glandes épithéliales, tel que proposé dans d'autres modèles (Stahl et al., 1997). Un fait intéressant à remarquer à propos de la chaîne $\alpha 3$ des laminines et des sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 4$ des intégrines est qu'elles sont associées avec la plupart des cellules épithéliales au niveau des glandes de l'antré pylorique. Cette observation corrèle avec les données histologiques qui stipulent que les glandes humaines de type antral sont en fait composées d'un fovéolus allongé et d'une courte portion glandulaire à la base peuplée de cellules G (gastrine; Rohrer, 1971; Krause et al., 1977).

Étant donné que la sous-unité $\alpha 7B$ démontre seulement un marquage faible au niveau de la surface et du fovéolus des glandes, ceci suggère un rôle mineur de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ dans l'homéostasie des cellules mucigènes. D'autre part, la sous-unité αv des intégrines est détectée dans les mêmes compartiments gastriques que la sous-unité $\alpha 7B$ en plus d'être retrouvée dans l'épithélium indifférencié. Sa localisation cellulaire aux zones de contacts cellule-cellule plutôt qu'à l'interface de la membrane basilaire, concorde avec l'association d' αv aux contacts focaux (Cone et al., 1994). De plus, la localisation de la sous-unité αv dans l'épithélium gastrique indifférencié suggère une implication possible lors d'événements morphogénétiques, tel que démontré dans l'endomètre et dans l'épithélium rénal (Breuss et al, 1995). Bien que la sous-unité $\alpha 5$ des intégrines soit présente à un faible niveau dans l'intestin foetal (Choy et al, 1990 ; Beaulieu et al., 1992), aucune expression de cette sous-unité n'a été détectée dans l'estomac foetal humain.

Les données obtenues pour la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines sont très intéressantes. Tout d'abord, sa localisation laisse entrevoir un rôle complexe de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la régulation des fonctions épithéliales et plus particulièrement dans la différenciation des cellules glandulaires.

Premièrement, au niveau de l'épithélium de surface et de l'épithélium fovéolaire, la sous-unité $\alpha 2$ est localisée au pôle basal des cellules ainsi qu'aux zones de contacts cellule-cellule. Il est important de remarquer que l'épithélium de surface tout comme l'épithélium fovéolaire expriment également la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines ainsi que la chaîne $\alpha 3$ des laminines. Dans ces deux compartiments, il serait donc possible qu'une association hétérogène entre les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ joue un rôle dans la communication intercellulaire, tel que proposé par l'équipe de Symington (1993).

Deuxièmement, les cellules pariétales qui expriment la pompe $H^+K^+ATPase$ sont dépourvues de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines, autant dans les glandes nouvellement formées que dans les glandes matures. Ce patron d'expression est particulièrement évident dans les régions du corps et du fundus puisque le nombre de cellules pariétales dans les glandes de ces régions est beaucoup plus élevé que dans les glandes de type antral. Si cet événement précoce et spécifique est instructif ou permissif pour la différenciation des cellules pariétales, différenciation qui a lieu avant

l'apparition des cellules du collet et des cellules principales dans la glande foetale humaine (Salenius, 1962), ceci apporterait de nouveaux indices prometteurs afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans la spécialisation de la fonction acidogénique ainsi que dans l'induction de gènes spécifiques comme la pompe $H^+K^+ATPase$ gastrique par exemple.

De plus, la possibilité que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ soit impliquée dans le processus d'élongation glandulaire reste à être élucidé via l'utilisation de cellules gastriques isolées, tel que vérifié précédemment dans des cultures tridimensionnelles d'épithélium mammaire (Berdichevsky et al., 1992; Keely et al., 1995a), ou de cellules Madlin-Darby Canine Kidney (MDCK) (Schwimmer et Ojakian, 1995) et dans le poumon foetal (Wu et Santoro, 1996).

Enfin, chez les spécimens plus âgés, nous avons observé que la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines devenait de plus en plus concentrée au niveau du pôle basal des cellules épithéliales qui de manière simultanée expriment fortement la laminine-2. Cette redistribution est observée vers l'âge de 18-20 semaines dans les glandes de type antral alors qu'elle se produit vers les 20-22 semaines de gestation dans les glandes de type fundique. Sachant qu'une forte expression de laminine-2 ainsi qu'une redistribution basale de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ sont associées avec la différenciation épithéliale et la sécrétion lactogénique dans les cultures de cellules glandulaires mammaires (Berdichevsky et al., 1992; Keely et al., 1995b), nous pouvons proposer qu'un

rapport similaire entre la laminine-2 et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait également être impliqué dans la différenciation de l'épithélium sécréteur de la glande gastrique humaine.

Finalement, étant donné que l'expression de la sous-unité $\alpha 3$ des intégrines est modulée à la baisse dans les glandes de type fundique alors qu'elle demeure exprimée dans les glandes de la région de l'antré pylorique, une expression coordonnée des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des intégrines pourrait être spécifiquement impliquée dans la différenciation des cellules principales de l'estomac, cellules qui synthétisent et sécrètent les deux zymogènes gastriques soit : la lipase gastrique humaine et le pepsinogène (Ménard et al., 1995). Ainsi, suite à cette étude, de nouvelles évidences viennent s'ajouter quant au rôle possible des laminines, et de leurs récepteurs intégrines, dans le développement des différents types cellulaires gastriques.

B) Caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87.

Dans un second temps, nous avons entrepris la caractérisation de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87 afin de vérifier son potentiel à titre de modèle cellulaire pour la régulation des fonctions digestives gastriques. Les premières données morphologiques ont permis de constater qu'en culture, la lignée NCI-N87 formait une monocouche épithéliale typique tout comme cela avait été observé pour la lignée gastrique cancéreuse AGS (Barraco et al., 1983). Étant donné que les molécules des *zonulae adherens* (jonctions

adhérentes) et des *zonulae occludens* (jonctions étanches) sont des composantes fonctionnelles des jonctions apicales de toutes les cellules épithéliales (Shimoyama et Hirohashi, 1991; Hanby et al., 1996), ces molécules jouent un rôle important dans le maintien des cellules ainsi que dans la polarité membranaire.

La présence et la distribution cellulaire de la protéine cadhérine-E, qui est un constituant des *zonulae adherens*, et de la protéine ZO-1, qui est un constituant des *zonulae occludens*, a été vérifiée dans des cultures sous-confluentes et post-confluentes de NCI-N87. Nous avons tout d'abord observé que toutes les cellules exprimaient la cadhérine-E au niveau de leur membrane cellulaire ce qui supportait l'existence de contacts cellule-cellule dans les cultures de NCI-N87. Les cellules NCI-N87 devenaient donc la première lignée cancéreuse à exprimer un marqueur de jonctions cellulaires puisque des données précédentes avaient tout d'abord démontré la présence d'un ARNm aberrant et l'absence de cette protéine dans la lignée gastrique cancéreuse KATO-III (Oda et al, 1994). Cette observation dans les KATO-III permettait du même coup d'expliquer, du moins en partie, pourquoi cette lignée cellulaire avait tendance à croître en suspension (Motoyama et al., 1986).

Une deuxième étude avait également démontré que les AGS étaient également dépourvues de cadhérine-E (Hsieh et al., 1996; Jawhari et al., 1999) au niveau de leur membrane ce qui expliquait pourquoi les

monocouches de AGS perdaient leur intégrité une fois la confluence atteinte. Contrairement aux AGS, les cultures de NCI-N87 post-confluentes maintiennent une morphologie épithéliale uniforme caractérisée par la présence de la protéine ZO-1, au niveau de la membrane cellulaire d'une sous-population de cellules, protéine qui est associée aux jonctions étanches. Ainsi, les cellules NCI-N87 exhibent un phénotype épithélial plus différencié que les lignées gastriques habituellement utilisées (AGS, Hs746t, KATO-III).

La majorité des lignées gastriques cancéreuses expriment le récepteur de l'EGF (Kamata et al., 1986; Lewis et al, 1993). Au cours du présent travail, nous avons pu démontrer que les cellules NCI-N87 expriment elles aussi l'EGFR au niveau de la membrane cellulaire des NCI-N87. De plus, nous avons démontré la présence de HGFR, KGFR, IGF1-R ainsi que du récepteur de l'insuline dans les NCI-N87. Par la suite, nos études ont permis de démontrer la présence des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 4$ des intégrines dans les cellules NCI-N87. Ainsi, nous avons pu constater que les sous-unités des intégrines qui semblaient avoir un rôle important à jouer lors du développement de la glande gastrique avaient été conservées dans cette lignée cancéreuse.

Afin de vérifier l'utilité de la lignée gastrique cancéreuse NCI-N87 pour l'étude des fonctions digestives gastriques, nous avons évalué la présence de marqueurs fonctionnels normalement associés à l'épithélium gastrique humain.

Premièrement, nous avons remarqué que les cellules exprimaient la sous-unité α de la pompe $H^+K^+ATPase$ normalement exprimée par les cellules pariétales de l'estomac. Ceci semble donc suggérer une activité fonctionnelle similaire aux cellules pariétales gastriques.

Dans un second temps, nous avons observé que les cellules exprimaient des glycoconjugués PAS-positif au niveau de leur cytoplasme ainsi que sous forme granulaire. Ceci suggérait donc une activité fonctionnelle reliée aux cellules à mucus gastriques dans la lignée NCI-N87, tel que proposé pour les cellules KATO-III (Yamamoto et al., 1990). Dans l'épithélium gastrique normal, la mucine-5 et la mucine-6 sont localisées dans deux populations distinctes de cellules. Ainsi, la mucine-5 est retrouvée au niveau des cellules à mucus de surface alors que ce sont les cellules à mucus du collet qui expriment la mucine-6 (De Bolos et al., 1995; Ho et al., 1995; Bartman et al., 1998).

Récemment, l'absence de l'ARNm de la mucine-6 et de la protéine dans un bon nombre de lignées gastriques cancéreuses a souligné leur capacité limitée d'agir à titre de modèle pour des études de différenciation mucopeptidique (Carvalho et al., 1999). Dans cette étude, nous avons observé la présence de mucine-6 dans la lignée NCI-N87 ce qui suggère pour la première fois dans l'histoire des lignées gastriques cancéreuses une similarité avec les cellules de type mucopeptidique. Au niveau de l'estomac

adulte humain, ce sont les cellules à mucus du collet exprimant la mucine-6 qui se transdifférencient en cellules pré-zymogéniques puis en cellules zymogéniques matures lors de leur migration vers la base de la glande (Karam et Leblond, 1992; De Bolos et al., 1995). Il semble donc qu'une proportion de cellules de la lignée NCI-N87 exprime des caractères mucigéniques et pré-zymogéniques similaires aux cellules du collet.

Étant donné que les cellules principales humaines sécrètent à la fois le pepsinogène et la lipase gastrique, des immunofluorescences indirectes et des dosages enzymatiques ont été effectués afin de vérifier la présence de ces enzymes dans la culture cellulaire de NCI-N87. Ceci nous a donc permis d'observer que la monocouche de NCI-N87 démontrait un fort marquage cytoplasmique pour le pepsinogène-5 ainsi que pour la lipase gastrique humaine. De plus, certaines cellules possédaient un marquage granulaire. Par la suite, nous avons pu observer, par dosage enzymatique, que les cellules NCI-N87 pouvaient non seulement synthétiser les enzymes gastriques mais qu'elles pouvaient également les sécréter de manière significative dans les milieux de culture. Ces caractéristiques étaient tout à fait nouvelles pour des lignées gastriques cancéreuses puisque aucune des lignées étudiées (AGS, KATO-III, Hs746t) précédemment dans notre laboratoire n'était capable de sécréter des niveaux significatifs de lipase gastrique humaine dans les milieux de culture (Basque et al., 1997). De plus, ces nouvelles caractéristiques rappelaient celles observées dans les cellules principales d'explants gastriques humains (Ménard et al., 1995) ou de cultures primaires

épithéliales (Basque et al., 1999). Par ailleurs, nous avons observé que les niveaux de HGL sécrétés dans les milieux augmentaient avec la post-confluence des cellules tandis que les niveaux de Pg-5 demeuraient constant tant dans les cellules que dans les milieux de culture. Cette régulation différentielle des enzymes à post-confluence rappelle leur évolution différente *in vivo* i.e. l'ontogénèse précoce de la lipase gastrique humaine (10-20 semaines) en comparaison avec celle du Pg-5 (naissance)(Ménard et al., 1995).

C) Modulation de l'activité enzymatique par des régulateurs exogènes.

Comme les cellules NCI-N87 possèdent de nombreux récepteurs de facteurs de croissance (EGFR, ins-R, KGFR) dont les effets trophiques sont reconnus au niveau de l'estomac, nous avons vérifié si l'ajout d'EGF, d'insuline, de KGF et d'Hc aux cultures de cellules permettait de moduler l'activité zymogénique de nos cellules. Ainsi, nous avons remarqué que lorsque les facteurs/hormones étaient ajoutés à confluence pour une période de 48 heures, seul le facteur de croissance épidermique (EGF) pouvait induire de façon constante et significative la synthèse et la sécrétion de lipase gastrique humaine. Ces facteurs n'avaient cependant eu aucun effet sur l'activité de la pepsine dans nos cultures. Cette réponse différentielle des deux zymogènes gastriques est en accord avec les études physiologiques qui suggèrent que les enzymes digestives gastriques peuvent répondre à un stimuli donné de manière indépendante (Chew et Hershey, 1982; Kasbekar et

al., 1983; Finks et al., 1985; Ménard et al., 1995). Cependant cette réponse positive des cellules au facteur EGF est en opposition avec ce qui a préalablement été observé dans des cultures d'explants gastriques et en culture primaire d'épithélium où l'EGF induisait une baisse de HGL dépendant de l'activité des kinases MAP ($p42^{\text{Erk-2}}$ / $p44^{\text{Erk-1}}$ et p38) sans affecter la néo-synthèse de pepsine (Tremblay et al., 1999; Basque et Ménard, 2000). Cette réponse contradictoire pourrait s'expliquer, du moins en partie, par l'action mitogénique d'EGF sur la monocouche dont la densité et la stabilité sont augmentées en présence du facteur. Cet effet d'EGF mimerait donc l'effet bénéfique de la post-confluence sur les niveaux d'activité de HGL dans les cellules et masquerait son effet répresseur direct sur le gène de la lipase gastrique (Basque et Ménard, 2000). De plus, nous avons observé que si le facteur de croissance EGF était ajouté à 6 jours post-confluence, période où le renouvellement de la monocouche est ralenti, celui-ci n'avait plus d'effet sur les niveaux de synthèse et de sécrétion des enzymes. Ainsi, à 6 jours post-confluence, il est plausible que l'EGF jouerait à la fois son rôle mitogénique, mais de moindre façon, ainsi que son rôle de répresseur direct du gène de HGL ce qui annulerait l'effet potentiel de ce facteur. Ces observations indiquent donc que l'application du présent modèle à l'étude de la régulation de HGL nécessite l'amélioration des liens cellule-substrat et l'inhibition des phénomènes de détachement/renouvellement.

D) Caractérisation d'un système de co-culture NCI-N87/HGE.34.

Comme nous avons pu le voir, le renouvellement constant de la lignée NCI-N87 semble être un facteur limitant pour son utilisation à titre de modèle pour l'étude de la régulation des fonctions digestives humaines. Ainsi, nous avons tenté de stabiliser l'adhésion de notre lignée en ensemençant les cellules NCI-N87 à haute densité sur une monocouche de fibroblastes gastriques. Dans un premiers temps, ceci nous a permis de constater qu'au lieu de former une monocouche, les cellules ainsiensemencées s'aggloméraient pour former des colonies très denses comme cela avait préalablement été observé avec des cellules Caco-2 (Vachon et al., 1993). De plus, nous avons remarqué que le détachement cellulaire qui était observé dans les cultures sur plastique était maintenant quasi inexistant. Ainsi, les fibroblastes gastriques avaient bel et bien la capacité d'optimiser l'attachement des cellules en culture.

Le potentiel sécréteur de la co-culture NCI-N87/HGE.34 paraissait amélioré puisque, 36 heures après l'ensemencement des cellules sur la monocouche de HGE.34, les niveaux de sécrétion de lipase gastrique étaient comparables aux niveaux observés dans une culture sur plastique à 10 jours post-confluence. Afin d'évaluer la capacité de cette co-culture à servir de modèle représentatif de l'épithélium zymogénique (cellules principales), nous avons ajouté divers facteurs ou hormones (EGF, ins, HGF, KGF, TGF β 1) à la culture pour vérifier les effets modulateurs de ceux-ci sur la synthèse et la

sécrétion zymogénique. L'addition de EGF et de KGF aux cellules en culture a permis de diminuer significativement les niveaux de pepsine sécrétés dans les milieux de culture. Ainsi, pour la première fois, des facteurs ont modulé efficacement l'activité pepsine. Un tel résultat diffère de ceux obtenus avec les autres lignées cancéreuses (Basque et al, 1997), les explants d'estomac fœtal humain (Tremblay et al, 1997) et les cultures primaires épithéliales fœtales (Basque et Ménard, 2000) où la synthèse/sécrétion de pepsinogène est minimale. Un fait encore plus intéressant à noter est que l'addition du facteur EGF à la co-culture a significativement diminué la synthèse de lipase gastrique dans les cellules ce qui mime l'effet préalablement observé dans les cultures primaires épithéliales (Basque et Ménard, 2000) et les explants gastriques (Tremblay et al, 1997). Ainsi, alors qu'EGF exerçait principalement son effet mitogénique dans les cultures sur plastique, il semblerait qu'en utilisant un système de co-culture où les cellules sont denses et stables dès le départ, le rôle mitogénique d'EGF sur les cellules soit minimisé. Par contre, ce dernier pourrait pleinement exercer son effet répresseur direct sur le gène de la lipase gastrique (Basque et Ménard, 2000) ce qui contribuerait à moduler à la baisse l'activité lipase dans les cellules.

E) Caractérisation de la lignée gastrique HGE.20.

Bien que le système de co-culture NCI-N87/HGE.34 semble représenter un bon modèle pour l'étude de la régulation du gène de la lipase gastrique, il ne conviendrait pas pour des études de différenciation à long

terme. Un épuisement et une acidification rapide des milieux résultent de la haute densité cellulaire et limitent la survie de nos cultures à 36 heures. L'objectif du clonage consistait dans un premier temps à produire une nouvelle lignée dont le phénotype serait stable et homogène puis dans un second temps à sélectionner si possible le phénotype zymogénique de la lignée NCI-N87.

Afin de vérifier l'efficacité du clonage, nous avons tout d'abord observé les variations phénotypiques des cultures. Une nouvelle lignée, que nous avons nommé HGE.20 (human gastric epithelium clone #20), formait une monocouche possédant un phénotype épithélial homogène de forme polygonal. Tout comme la lignée NCI-N87 dont elle est originaire, la lignée HGE.20 peut être maintenue à post-confluence. Un autre fait intéressant à remarquer est que la monocouche de HGE.20 exhibait une capacité d'attachement nettement supérieure à la lignée NCI-N87. Ce caractère était prometteur puisque comme on l'a vu précédemment, il semblerait que la densité et la stabilité de la monocouche épithéliale soient des pré-requis pour une réponse adéquate aux facteurs de croissance régulant la synthèse/sécrétion zymogénique. Par la suite, nous avons confirmé la présence de la protéine associée aux jonctions adhérentes (*zonulae adherens*) soit la cadhérine-E. L'expression uniforme de cette dernière dans la monocouche n'avait rien de surprenant puisque chacune des cellules composant la lignée mère exprimait également la cadhérine-E au niveau de leur membrane cellulaire. Cependant, lors de l'étude de la protéine ZO-1,

protéine associée aux jonctions étanches (*zonulae occludens*), la monocouche entière exhibait un marquage positif pour la ZO-1 contrairement à la lignée NCI-N87 où seulement une sous-population de cellules exprimait cette protéine. Nous étions donc en présence d'une lignée gastrique cancéreuse possédant les propriétés d'une monocouche totalement uniforme.

Le statut de spécialisation zymogénique de la lignée HGE.20 semblait également amélioré puisque les expériences d'immunofluorescence indirecte révèlent un accroissement du marquage granulaire et une diminution de l'immunoréactivité cytoplasmique diffuse. Ceci laissait donc croire que la nouvelle lignée gastrique HGE.20 possédait une capacité accrue de synthèse des enzymes digestives comparativement à sa lignée parentale. Par dosages enzymatiques, nous avons bel et bien observé des niveaux de synthèse zymogénique (Pg-5 et HGL) augmentés dans les HGE.20 à confluence en comparaison à des cultures de NCI-N87 confluentes. De plus, les niveaux de sécrétion de lipase gastrique dans les milieux de culture des HGE.20 correspondaient aux niveaux obtenus dans les cultures de NCI-N87 à 10 jours post-confluence. Tout comme chez la lignée NCI-N87, l'activité pepsine ne semble pas modulée avec la post-confluence. Il fut surprenant de constater, à première vue, que les niveaux de sécrétion de HGL n'augmentaient pas durant la post-confluence et que l'activité de néo-synthèse (activité dans les cellules) diminuait. Néanmoins, nos résultats indiquent clairement que la lignée HGE.20 exprime des niveaux augmentés d'enzymes et que la progression du programme de différenciation fonctionnelle nécessite des

facteurs qui sont absents dans les conditions minimales de culture. Ce caractère ou comportement diffère de la lignée Caco-2, un modèle de référence de la différenciation entérocytaire, qui est capable d'initier sa différenciation terminale en culture (Chantret et al., 1988).

Au cours de la dernière année, des travaux effectués dans notre laboratoire ont suggéré l'existence d'une synergie entre les laminines et le facteur de croissance TGF β 1. En effet, ces travaux ont permis de démontrer que des cultures primaires d'épithélium gastrique cultivées sur une matrice de laminine-1 ou de laminine-2 et mis en présence de TGF β 1, exprimaient des niveaux de lipase gastrique humaine remarquablement élevés (Basque et al., 2000). Nous avons donc voulu vérifier si notre nouvelle lignée gastrique cancéreuse pouvait mimer la réponse du tissu normal lorsque cultivée dans les mêmes conditions. Ainsi, les cellules HGE.20 ont étéensemencées sur une matrice de laminine-1 et mises en présence de TGF β 1. Cette expérience a permis de démontrer que, bien que la sécrétion de la lipase gastrique semble avoir tendance à augmenter dans les cultures où les deux molécules sont présentes, cette stimulation n'est cependant pas optimale et elle est non significative. Nous ne retrouvons donc pas le synergisme préalablement observé dans les cultures primaires d'épithélium.

La réponse sous-optimale des cellules HGE.20 pourrait s'expliquer par un manque de TGF β R-II fonctionnel au niveau des cellules HGE.20 comme cela a déjà été démontré dans de nombreuses lignées cancéreuses (Sun et

al., 1994; Myeroff et al., 1995; Koli et Arteaga, 1997). De plus, des études effectuées sur des cellules cancéreuses mammaires ont démontré qu'une présence prédominante de TGF β R-II au niveau du cytosol de ces cellules était responsable de la perte de réponse de celles-ci au TGF β 1. L'absence de TGF β R-II au niveau de la membrane de ces cellules empêcherait donc un contrôle négatif de la croissance cellulaire généralement induit par le TGF β (Koli et Arteaga, 1997). Afin de vérifier si ce phénomène pouvait être responsable du manque de réponse des cellules HGE.20 au TGF β 1, nous avons vérifié la localisation du TGF β R-II dans ces cellules à l'aide de la technique d'immunofluorescence indirecte. Les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'effectivement, le récepteur II du TGF β est majoritairement présent au niveau du cytoplasme des cellules et non à la membrane cellulaire (figure 34D) ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, la stimulation sous-optimale des HGE.20 lorsque cultivées sur une matrice de laminine-1 et lorsque mises en présence de TGF β 1. Ainsi, il serait intéressant de restaurer le pool membranaire de TGF β R-II par transfection du gène normal dans les HGE.20 et de vérifier l'impact de ce changement sur l'amélioration du statut zymogénique fonctionnel.

V. CONCLUSIONS

Dans un premier temps, nous avons localisé les diverses sous-unités des intégrines ainsi que la laminine-5 dans l'estomac fœtal afin de vérifier un rôle potentiel dans la différenciation des types cellulaires gastriques et/ou dans la synthèse/sécrétion des enzymes digestives. Effectivement, les résultats obtenus démontrent une localisation différentielle des différentes sous-unités des intégrines qui semble corrélér 1) avec la distribution ubiquitaire ou compartimentée des laminines le long de l'axe fovéolus-glande, et 2) avec la différenciation des types épithéliaux spécifiques.

L'objectif global de la deuxième partie de mon projet consistait à trouver un modèle cellulaire qui soit représentatif de l'épithélium gastrique glandulaire. Celui-ci permettrait de contourner le facteur limitant de nos études soit la disponibilité de tissus fœtaux. De plus, des études extensives et à long terme pourraient ainsi être effectuées afin de mieux comprendre et de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant la synthèse/sécrétion des zymogènes gastriques. Dans le premier volet de cette deuxième partie, nous avons caractérisé la nouvelle lignée gastrique cancéreuse NCI-N87. Ainsi, nous avons démontré que celle-ci exprime plusieurs marqueurs fonctionnels normalement associés à l'épithélium gastrique humain. Comparativement aux lignées de référence, elle exhibe un phénotype épithélial différencié, des jonctions spécialisées et elle peut être maintenue à post-confluence. De plus, la synthèse et la sécrétion de HGL (49 kD) et du Pg-5 (34 kD) sont

significatives. Un modèle de co-culture de NCI-N87 sur des fibroblastes nourriciers a ensuite été mis au point. Celui-ci optimise l'adhésion cellulaire, la densification des colonies épithéliales et la synthèse des zymogènes gastriques. L'addition d'EGF y induit une baisse des niveaux de sécrétion de HGL, tel qu'observé dans le tissu foetal. Finalement, le clonage de la lignée NCI-N87 permet de générer la nouvelle lignée HGE.20, première lignée gastrique cancéreuse à posséder les caractéristiques d'une monocouche barrière, homogène et cohérente ainsi qu'une capacité de synthèse zymogénique accrue. De plus, cette nouvelle lignée a permis d'établir qu'en condition minimale de culture, les cellules HGE.20 ne pouvaient pas par elles-mêmes initier ou du moins progresser dans leur processus de différenciation. La réponse sous-optimale des cellules à la combinaison laminine-1 plus TGF β 1 semble indiquer que la lignée gastrique cancéreuse HGE.20 ne représente pas un modèle d'étude adéquat pour élucider spécifiquement les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de différenciation fonctionnelle de l'épithélium gastrique induit par le facteur de croissance TGF β .

En perspective, il serait intéressant d'élucider la signification de la localisation cytoplasmique du TGF β R-II dans les cellules HGE.20. Ainsi, il faudrait vérifier si la protéine est mutée puisque si c'était le cas, il se pourrait que la mutation affecte directement la protéine, ce qui la rendrait inactive. Une mutation de la protéine dans son domaine de localisation pourrait également affecter le routage de la protéine vers la membrane des cellules ce

qui résulterait en une absence de réponse au TGF β . De plus, il serait pertinent de vérifier si le compartiment vésiculaire intracellulaire impliqué dans les voies de recyclage et de sécrétion cellulaire est fonctionnel dans les cellules HGE.20 puisqu'il a été démontré que l'absence de récepteurs membranaires et de réponse au TGF β dans les cellules mammaires MCF-7 résulte de l'immaturité de ce compartiment (Koli et Arteaga, 1997). Il serait également intéressant de transfecter le récepteur II du TGF β dans les cellules HGE.20 afin de vérifier si cette transfection ne pouvait pas restaurer le pool de récepteur membranaire dans nos cellules et ainsi permettre une réponse cellulaire mimant la réponse obtenue en cultures primaires. Cette stratégie a permis de corriger le routage du récepteur II du TGF β tout en rétablissant la réponse cellulaire au TGF β dans les cellules MCF-7 (Sun et al, 1994). Si une telle transfection s'avérait efficace dans notre modèle, il serait opportun de disséquer les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la modulation à la hausse de la lipase gastrique dans le système laminine-1/TGF β 1.

Alternativement, il serait pertinent d'évaluer les effets d'anticorps neutralisants dirigés contre les sous-unités des intégrines sur la synthèse/sécrétion stimulée par TGF β /laminine-1. Le modèle cellulaire HGE.20 permettrait enfin de vérifier l'hypothèse que nous avons formulée voulant que la différenciation et/ou la spécialisation fonctionnelle des cellules principales soit coordonnée par l'expression sélective de la sous-unité α 2 des intégrines et la répression de la sous-unité α 3.

VI. REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Docteur Daniel Ménard qui, de par ses nombreuses qualités scientifiques et pédagogiques, m'a permis de mener à terme ce projet de maîtrise. Je lui dois ma profonde gratitude ainsi que tout mon respect pour m'avoir accueillie parmi son équipe de travail.

Je désire également dire un gros merci au Docteur Pierre Chailler qui, de par ses nombreuses qualités humaines, scientifiques et pédagogiques, m'a permis de mener à bien mon projet dans une atmosphère de motivation, d'apprentissage et de plaisir. Merci pour toutes les petites leçons tant scientifiques que personnelles et pour l'aide apportée lors des expériences.

Je tiens à remercier affectueusement Madame Lina Corriveau d'avoir bien voulu partager avec moi ses nombreuses connaissances et son expertise technique notamment en immunofluorescence indirecte. Merci également pour les bons moments passés ensemble.

Je me dois de remercier ma consœur de travail Madame Marie-Ève Lizotte pour sa précieuse amitié, son soutien moral ainsi que pour les bons moments passés en sa compagnie à bavarder ou à manger du « Subway ». Merci d'être comme tu es.

Je veux également remercier Monsieur Jean-René Basque qui m'a guidée dans le monde de la biologie moléculaire et l'univers des Western blot. Merci d'avoir mis de la vie dans le laboratoire via tes discussions «pseudo» philosophiques...

Je désire également remercier le Docteur Jean-François Beaulieu pour les anticorps fournis afin d'étudier la localisation des sous-unités des intégrines dans l'estomac fœtal humain.

Finalement, je remercie tous les membres du département d'anatomie et de biologie cellulaire (étudiantes, étudiants, professeurs, secrétaires et techniciens) pour leur camaraderie et pour la vie que tout ce beau monde met sur le département.

VII. BIBLIOGRAPHIE

Abrams C.K., Hamosh M., Hubbard V.S., Dutta S.K., Hamosh P., Lingual lipase in cystic fibrosis : Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. J Clin Invest, 1984; 73 : 374-382.

Abrams C.K., Hamosh M., Dutta S.K., Hubbard V.S., Hamosh P., Role of nonpancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. Gastroenterology, 1987; 92 : 125-129.

Abrams C.K., Hamosh M., Lee T.C., Ansher A.F., Collen M.J., Lewis J.H., Benjamin S.B., Hamosh P., Gastric lipase : localization in the human stomach. Gastroenterology, 1988 ; 95 : 1460-1464.

Akiyama S.K., Yamada S.S., Chen W.T., Yamada K.M., Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies : roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. J Cell Biol, 1989; 109(2) : 863-875.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Molecular biology of the cell. Éditions Garland Publishing Inc., New York, 1994; 952-961.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Molecular biology of the cell. Éditions Garland Publishing Inc., New York, 1994; 989-1000.

Anson ML, Mirky AE., The estimation of pepsin with hemoglobin. J Gen Physiol, 1932; 10 : 342-344.

Barraco S.C., Townsend C.M., Casartelli C., Macik B.G., Burger N.L., Boerwinkle W.R., Gourley W.K., Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res, 1983; 43 : 1703-1709.

Bartman A.E., Buisine M.P., Aubert J.P., Niehans G.A., Toribara N.W., Kim Y.S., Kelly E.J., Crabtree J.E., Ho S.B., The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. J Pathol, 1998; 186 : 398-405.

Basora N., Vachon P.H., Herring-Gillam E., Perreault N., Beaulieu J.-F., Relation between integrin $\alpha 7 \beta 1$ expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. Gastroenterology, 1997; 113 : 1510-1521.

Basque J.R., Chailier P., Ménard D., TGF β and laminins synergistically regulate human gastric lipase activity. *Gastroenterology*, 2000; 118 (4, suppl 2) : A287.

Basque J.R., Tremblay E., Chailier P., Ménard D., Do gastric cancer cells lines represent suitable models to study human gastric epithelial differentiation? *Can J Gastroenterol*, 1997; 11 (suppl A) : 81A.

Basque J.R., Chailier P., Perreault N., Beaulieu J.F., Ménard D, A new primary culture system representative of the human gastric epithelium. *Exp Cell Res*, 1999; 253 : 493-502.

Basque J.R., Ménard D., Establishment of culture systems of human gastric epithelium for the study of pepsinogen and gastric lipase synthesis and secretion. *Microscopy research and technique*, 2000; 48 : 293-302.

Beaulieu J.F., Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci*, 1992; 102 : 427-436.

Beaulieu J.-F., Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem*, 1997; 34 : 1-76.

Belfrage P and Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labelled oleic acid from mixture with glycerides. *J Lip Res* 1969; 10 : 341-344.

Berdichevsky F., Gilbert C., Shearer M., Taylor-Papadimitriou J., Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells : the role of the $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J Cell Sci*, 1992; 102 : 437-446.

Bernadac A., Moreau H., Verger R., Gastric lipase and pepsinogen during the ontogenesis of rabbit gastric glands. *European Journal of Cell Biology*, 1991; 55 : 149-157.

Bernback S., Blackberg L., Human gastric lipase. The N-terminal tetrapeptide is essential for lipid binding and lipase activity. *Eur J Biochem*, 1989; 182 : 495-400.

Bodmer M.W., Angal S., Yarraton G.T., Harris T.J.R., Lyons A., King D.J. et al., Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 909 : 237-244.

Borovicka J., Schwizer W., Mettraux C., Kreiss C., Remy B., Asal K., Jansen J.B., Douchet I., Verger R., Fried M., Regulation of gastric and pancreatic lipase secretion by CCK and cholinergic mechanisms in humans. *Am J Physiol*, 1997; 273 : G374-380.

Breuss J.M., Gallo J., DeLisser H.M., Klimanskaya I.V., Folkesson H.G., Pittet J.F., Nishimura S.L., Aldape K., Landers D.V., Carpenter W., et al., Expression of the beta 6 integrin in development, neoplasia and tissue repair suggest a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci*, 1995; 108 : 2241-2251.

Carrière F., Raphel V., Moreau H., Bernadac A., Devaux M.-A., Grimaud R., Barrowman J.A., Bénicourt C., Junien J.-L., Laugier R., Verger R., Dog gastric lipase : stimulation of its secretion in vivo and cytolocalization in mucous pit cells. *Gastroenterology*, 1992; 102 : 1535-1545.

Carvalho F., David L., Aubert J.P., Lopez-Ferrer A., De Bolos C., Reis C.A., Gartner F., Peixoto A., Alves P., Sobrinho-Simoes M., Mucins and mucin-associated carbohydrate antigens expression in gastric carcinoma cell lines. *Virchows Arch*, 1999; 435 : 479-485.

Champlaud M.F., Lunstrum G.P., Rousselle P., Nishiyama T., Keene D.R., Burgeson R.E., Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*, 1996; 132 : 1189-1198.

Chantret I., Barbat A., Dussaulx E., Brattain M.G., Zweibaum A., Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultures human colon carcinoma cells : a survey of twenty cell lines. *Cancer Res*, 1988; 48 : 1936-1942.

Chew C.S., Hershey S.J., Gastrin stimulation of isolated gastric glands. *Am J Physiol*, 1982; 240 : G504-512.

Choy M.Y., Richman P.I., Horton M.A., MacDonald T.T., Expression of the VLA family of integrins in human intestine. *J Pathol*, 1990; 160 :35-40.

Cohen M., Morgan G.R.H., Hofmann A.F., Lipolytic activity of human gastric and duodenal juice against medium and long-chain triglycerides. *Gastroenterology*, 1971; 60 : 1-15.

Collo G., Starr L., Quaranta V., A new isoform of the laminin receptor $\alpha 7 \beta 1$ is developmentally regulated in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1993; 268 : 19019-19024.

Cone R.I., Weinacker A., Chen A., Sheppard D., Effects of beta subunits cytoplasmic deletions on the recruitment of the integrin $\alpha v \beta 6$ to focal contacts. *Cell Adhes Commun*, 1994; 2 : 101-113.

Cooper C.S., Park M., Blair D.G., Tainsky M.A., Huebner K., Croce C.M., Van De Woude G.F., Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 1984; 311 : 29-33.

De Bolos C., Garrido M., Real F.X., MUC6 Apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology*, 1995; 109 : 723-734.

Dipalma J., Kirk C., Hamosh M., Colon A.R., Benjamin S.B., Hamosh P., Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children and adults. *Gastroenterology*, 1991; 101 : 116-120.

Fain G.L., Smolka A., Cilluffo M.C., Fain M.J., Lee D.A., Brecha N.C., Sachs G., Monoclonal antibodies to the H⁺-K⁺ ATPase of gastric mucosa selectively stain the non-pigmented cells of the rabbit ciliary body epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988; 29(5) : 785-794.

Finks C.S., Hamosh M., Hamosh P., Denigris S.J., Kasbekar D.K., Lipase secretion from dispersed rabbit gastric glands. *Am J Physiol*, 1985; 248 : G68-G72.

Fiorucci S., McArthur K.E., Gastrin-releasing peptide directly releases pepsinogen from guinea pig chief cells. *Am J Physiol*, 1990; 259 : G760-766.

Freed E., Gailit J., van der Geer P., Ruoslahti E., Hunter T., A novel integrin beta subunit is associated with the vitronectin receptor alpha subunit (alpha v) in a human osteosarcoma cell line and is a substrate for protein kinase C. *EMBO J*, 1989; 8(10) : 2955-2965.

Fukamachi H., Ichinose M., Tsukada S., Kakei N., Suzuki T., Miki K., Kurokawa K., Masui T., Hepatocyte growth factor region specifically stimulates gastro-intestinal epithelial growth in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm*, 1994; 205 :1445-1451.

Gargouri Y., Pieroni G., Rivière C., Lowe P.A., Saunière J.F., Sarda L., Verger R., Importance of human lipase for intestinal lipolysis : an in vitro study. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 879 : 419-423.

Gargouri Y., Piéroni G., Rivière C., Saunière J.F., Sarda L., Verger R., Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology*, 1986b; 91 : 919-925.

Gargouri Y., Moreau H., Pieroni G., Verger R., Human gastric lipase : a sulfhydryl enzyme. *J Biol Chem*, 1988; 263 : 2159-2162.

Gargouri Y., Moreau H., Verger R., Gastric lipases : Biochemical and physiological studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 1006 : 255-271.

Hamosh M., in *Lipases*, Éditions Borgström B. et Brockman H.L., Elsevier, Amsterdam, 1984; 49-81.

Hamosh M., Hamosh P., Lingual and gastric lipases during development. Human Gastrointestinal Development, Éditions Lebenthal E., Raven Press, New York, 1989; 251-276.

Hamosh M., Lingual and gastric lipases : their role in fat digestion. CRC Press, Boca Raton, Floride, 1990; 1-239.

Hamosh M., Lingual and gastric lipases. Nutrition, 1990; 6 : 421-428.

Hamosh M., Dans: Lingual and gastric lipases : their role in fat digestion. Boca Raton : CRC Press, 1990; 1-239.

Hamosh M., Dans : Physiology of the gastrointestinal tract. Édition Leonard R. Johnson, Raven Press, New York, 1994; 1239-1253.

Hattori Y., Odagiri H., Nakatani H., Miyagawa K., Naito K., Sakamoto H., Katoh O., Yoshida T., Sugimura T., Terada M., K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. Proc Natl Acad Sci, 1990; 87 : 5983-5987.

Hanby A., Chinery R., Poulsom R., Playford R.J., Pignatelli M., Downregulation of E-cadherin in the reparative epithelium of the human gastrointestinal tract. Am J Pathol, 1996; 148 :723-729.

Hershey S.J., Owirodu A., Miller M., Forskolin stimulation of acid and pepsinogen secretion by gastric glands. *Biochim Biophys Acta*, 1983; 755 : 293-299.

Ho S.B., Robertson A.M., Shekels L.L., Lyftogt C.T., Niehans G.A., Toribara N.W., Expression cloning of gastric complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology*, 1995;109 : 735-747.

Hsieh M.C., Wu C.W., Wu L.H., Lui W.Y., Peng F.K., Yu C.L., Heat shock and cytokines modulate the expression of adhesion molecules on different human gastric cancer cell lines. *Int J Cancer*, 1996; 67 : 690-694.

Jawhari A.U., Noda M., Farthing M.J., Pignatelli M., Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 1999; 80 : 322-330.

Karam S.M., Leblond C.P., Identifying and counting all epithelial cell types present in the « corpus » of the mouse stomach. *Anat. Rec.*, 1992; 232 : 231-246.

Karam S.M., Leblond C.P., Origin and migratory Pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach. *Microscopy research and technique*, 1995; 31 : 193-214.

Kasbekar D.K., Jensen R.T., Gardner J.D., Pepsinogen secretion from dispersed glands from rabbit stomach. *Am J Physiol*, 1983; 244 : G392-396.

Kato K., Chen M.C., Nguyen M., Lehmann F.S., Podolsky D.K., Soll A.H., Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am J Physiol*, 1999; 276(5 Pt 1) : G1105-16.

Koli K.M., Arteaga C.L., Predominant cytosolic localization of type II transforming growth factor β receptors in human breast carcinoma cells., *Cancer research*, 1997; 57 : 970-977.

Keely P.J. Fong A.M., Zutter M.M. Santoro S.A., Alteration of collagen-dependant adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisens $\alpha 2$ integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci*; 1995a; 108 : 595-607.

Keely P.J., Wu J.E., Santoro S.A., The spacial and temporal expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation*, 1995b; 59 : 1-13.

Kirk C.L., Hamosh M., Initial lipolysis by gastric lipase is essential for the hydrolysis of milk or formula fat by milk lipase. *Faseb J*, 1991; 5 : A1288.

Krause W.J., Ivey K.J., Baskin W.N., MacKercher P., Ultrastructure of the human pyloric glands with emphasis on the mucous cell component. *Acta Anat*, 1977; 99 : 1-10.

Kumegawa M., Takuma T., Hosoda S., Kunii S., Kanda Y. Precocious induction of pepsinogen in the stomach of suckling mice by hormones. *Biochem Biophys Acta*, 1978; 543 : 243-250.

Lanas A.I., Anderson J.W., Uemura N., Hirschowitz B.I., Effects of cholinergic, histaminergic and peptidergic stimulation on pepsinogen secretion by isolated human peptic cells. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29 : 678-683.

Lee P.C., Borysewicz R., Struze M., Raab K., Werlin E.T., Development of lipolytic activity in gastric aspirates from premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1993; 17 : 291-297.

Lin Y.H., Wang X.F., Hg-Eaton E., Weinberg R.A., Lodish H.F., Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*, 1992; 68(4) : 775-785.

Lohse P., Lohse P., Chahrokh-Zadeh S., Seidel D., The acid lipase gene family : three enzymes, one highly conserved gene structure. *Journal of lipid Research*, 1997; 38 : 880-891.

Lowry OH, Rosebrough NF, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951;193 :265-275.

Marieb E.N., *Anatomie et physiologie humaines*, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1993; 769-786.

Marinkovich M.P., Lunstrum G.P., Keene D.R., Burgeson R.E., The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol*, 1992; 119(3) : 695-703.

Matsubara Y., Ichinose M., Tatematsu M., Ichinose M., Oka M., Yahagi N., Kurokawa K., Kageyama T., Miki K., Fukamachi H., Stage-specific elevated expression of the genes for hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, and their receptors during the morphogenesis and differentiation of rat stomach mucosa. *Biochem Biophys Res Comm*, 1996; 222 : 669-677.

Ménard D., Monfils S., Tremblay E., Ontogeny of the gastric lipase and pepsin activities. *Gastroenterology*, 1995; 108 : 1650-1656.

Ménard D, Basque J.R., Gastric Digestive Function. *Gastrointestinal functions*, édité par Edgard E. Delvin et Michael J. Lentze. Nestlé nutrition workshop series, Pediatric program, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie. 2001; 46 : 147-163.

Moreau H., Langier R., Gargouri Y., Ferrato F., Verger R., Human préduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology*, 1988; 95 : 1221-1226.

Moreau H., Gargouri Y., Lecat D., Junien J.L., Verger R., Screening of preduodenal lipases in several mammals, *Biochim Biophys Acta*, 1988; 959, 247-252.

Moreau H., Bernadac A., Gargouri Y., Benkarka F., Laugier R., Verger R., Immunocytolocalization of human gastric lipase in chief cells of the fundic mucosa. *Histochemistry*, 1989; 91 : 419-423.

Motoyama T. Hojo H., Watanabe H., Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol Jpn*, 1986; 36 : 65-83.

Myeroff L.L., Parsons R., Kim S.J., Hedrick L., Cho K.R., Mathis M., Kinzler K.W., Lutterbaugh J., Park K., Bang Y.J., Lee H.Y., Park J.G., Lynch H.T., Roberts A.B., Vogelstein B., Markowitz S.D., A transforming growth factor β receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer research*, 1995; 55 : 5545-5547.

Oda T., Kanai Y., Oyama T., Yoshiura K., Shimoyama Y., Birchmeier W., Sugimura T., Hirohashi S., E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91 : 1858-1862.

Perreault N, Vachon P.H., Beaulieu J.F., Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1 and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Rec*, 1995; 242(2) : 242-250.

Phillips R.J., Aplin J.D., Lake B.D., Antigenic expression of integrin alpha 6 beta 4 in junctional epidermolysis bullosa. *Histopathology*, 1994; 24(6) : 571-576.

Poretsky L., Grigorescu F., Seibel M., Moses A.C., Flier J.S., Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985; 61(4) : 728-734.

Raufman J.P., Sutliff V.E., Kasbekar D.K., Jensen R.T., Gardner J.D., Pepsinogen secretion from dispersed chief cells from guinea pig stomach. *Am J Physiol*, 1984; 247 : G95-104.

Rohrer G.V., Human gastric mucosa : correlation of structure and function. *Am J Clin Nutr*, 1971; 24 : 137-143.

Rokutan K., Yamada M., Torigoe J., Saito T., Transforming growth factor-beta inhibits proliferation and maturation of cultured guinea pig gastric pit cells. *Am J Physiol*, 1998; 275(3 Pt 1) : G526-33.

Rosenzweig S.A., Zetterstrom C., Benjamin A., Identification of retinal insulin receptors using site-specific antibodies to carboxyl-terminal peptide of the human insulin receptor alpha-subunit. Up-regulation of neuronal insulin receptors in diabetes. *J Biol Chem*, 1990; 265(29) : 18030-18034.

Rutten M.J., Harmon P., Campbell D.R., Insulin enhances epidermal growth factor- and transforming growth factor-alpha-stimulated growth in primary cultures of guinea pig gastric mucous epithelial cells. *Scand J Gastroenterol*, 1991; 26(9) : 965-973.

Salenius P., On the ontogenesis of the human gastric epithelial cells. *Acta Anat (Basel)*, suppl, 1962; 46 :1-75.

Schwimmer R, Ojakian G.K., The $\alpha 2\beta 1$ integrin regulates collagen-mediated MDCK epithelial membrane remodeling and tubule formation. *J Cell Sci*, 1995; 108 : 2487-2498.

Shaw J.P., Akiyoshi D.E., Arrigo D.A. Rhoad A.E., Sullivan B., Thomas J., Genbauffe F.S., Bacha P., Nichols J.C., Cytotoxic properties of DAB486EGF and DAB389EGF, epidermal growth factor (EGF) receptor-targeted fusion toxins. *J Biol Chem*, 1991; 266(31) : 21118-21124.

Shimoyama Y., Hirohashi S., Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res*, 1991; 51 : 2185-2192.

Song W.K., Wang W., Sato H., Biesler D.A., Kaufman S.J., Expression of $\alpha 7$ integrin cytoplasmic domains during skeletal muscle development : alternate forms, conformational change, and homologies with serine/threonine kinases and tyrosine phosphatases. *J Cell Sci*, 1993; 106 : 1139-1152.

Sonneenbergh A., Janssen H., Hogervorst F., Calafat J., Hilgers J., A complex of platelet glycoproteins Ic and Iia identified by a rat monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 1987; 262(21): 10376-10383.

Stahl S., Weitzman S., Jones J.C., The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci*, 1997; 110 : 55-63.

Stevens A., Lowe J., *Histologie*, Éditions Pradel, 1992; 160-164.

Streeter GL. Weight, sitting head, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. *Contr Embryol* 1920;11 :143-179.

Sun L., Wu G., Willson J.K.V., Zborowska E., Yang J., Rajkarunanayake I., Wang J., Gentry L.E., Wang X.F., Brattain M.G., Expression of transforming growth factor β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269 : 26449-26455.

Symington B.E., Takada Y., Carter W.G., Interaction of integrins $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. *J Cell Biol*, 1993;120 : 523-535.

Takada Y., Wayner E.A., Carter W.G., Hemler M.E., Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J Cell Biochem*, 1988; 37(4) : 385-393.

Takahashi M., Ota S., Shimada T., Hamada E., Kawabe T., Okudaira T., Matsumura M., Kaneko N., Terano A., Nakamura T., Omata M., Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. *J Clin Invest*, 1995; 95 : 1994-2003.

Thomas JO et Kornberg RD. An octamer of histone in chromatin and free solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72 : 2626-2630.

Tiruppathi C., Balasubramanian K.A., Purification and properties of an acid lipase from human gastric juice. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 712 : 692-697.

Toribara N.W., Robertson A.M., Ho S.B., Kuo W.L., Gum E., Hicks J.W., Gum J.R. Jr., Byrd J.C., Siddiki B., Kim Y.S., Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem*, 1993; 268(8) : 5879-5885.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 :4350-4354.

Tremblay E., Ménard D., Differential expression of extracellular matrix components during the morphogenesis of human gastric mucosa. *Anat Rec*, 1996; 245 : 668-676.

Tremblay E., Basque J.R., Rivard N., Ménard D., Epidermal growth factor and transforming growth factor- α down-regulate human gastric lipase gene expression. *Gastroenterology*, 1999; 116 : 831-841.

Tremblay E., Chailier P., Menard D., Coordinated control of fetal gastric epithelial functions by insulin-like growth factors and their binding proteins. *Endocrinology*, 2001;142 : 1795-1803.

Tsarfaty I., Rong S., Resau J.H., Rulong S., da Silva P.P., Vande Woude G.F., The Met-proto-oncogene mesenchymal to epithelial cell conversion. *Science*, 1994; 263(5143) : 98-101.

Tseng C.-C., Johnson L.R., Role of thyroxine in functional gastric development. *Am J Physiol*, 1986; 250 : G111-G116.

Tsukada S., Ichinose M., Tatematsu M., Tezuka N., Yonezawa S., Kakei N., Matsushima M., Miki K., Kurokawa K., Kageyama T., Takahashi K., Fukamachi H. Glucocorticoids inhibit the proliferation of mucosal cells and enhance the expression of a gene for pepsinogen and other markers of differentiation in the stomach mucosa of the adult rat., *Biochemical and biophysical research communications*, 1994; 202 : 1-9.

Vachon P.H., Durand Josée, Beaulieu J.F., Basement membrane formation and re-distribution of the $\beta 1$ integrins in a human intestinal co-culture system. *The anatomical record*, 1993; 236 : 567-576.

Virtanen I., Tani T., Bäck N., Häppölä O., Laitinen L., Kiviluoto T., Salo J., Burgeson R.E., Lehto V.-P., Kivilaakso E., Differential expression of laminin chains and their integrin receptors in human gastric mucosa. *Am J of Pathol*, 1995; 147 : 1123-1132.

Wayner E.A. et Carter W.G., Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J Cell Biol*, 1987; 195(4) : 1873-1884.

Worjdemann M., Olsen O., Norregaard P., Sternby B., Rehfeld J.F., Gastric lipase secretion after sham feeding and cholonergic blockade. *Dig Dis Sci*, 1997; 42 : 1070-1075.

Wu J.E., Santoro S.A., Differential expression of integrin a subunits supports distinct role during lung branching morphogenesis. *Dev Dyn*, 1996; 206 :169-181.

Yamamoto R., Iishi H., Tatsuta M., Nakamura H., Terada N., Komatsu K., Matsusaka T., Enhancement of mucous accumulation in a human gastric scirrhou carcinoma cell line (KATO-III) by fibroblast-tumor cell interaction. *Virchows Arch*, 1990; 59 : 26-31.

VIII. LISTE DES PUBLICATIONS

M. Chénard, J.-R. Basque, P. Chailier, J.-F. Beaulieu and D. Ménard, Expression of integrin subunits correlates with differentiation of epithelial cell lineages in developing human gastric mucosa. Anatomy and embryology, 2000; 202 :223-233.

J.-R. Basque, **M. Chénard**, P. Chailier and D. Ménard, Gastric cancer cells lines as models to study human digestive fonctions. Journal of Cellular Biochemistry, 2001; 81 :241-251.